

10/525020  
PCT/JP03/01718#2

日 本 国 特 許  
JAPAN PATENT OFFICE

Rec'd PCT/PTO 18 FEB 2005

18.02.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日  
Date of Application:

2002年 8月19日

REC'D 11 APR 2003

出 願 番 号  
Application Number:

特願2002-238559

WIPO PCT

[ST.10/C]:

[JP2002-238559]

出 願 人  
Applicant(s):

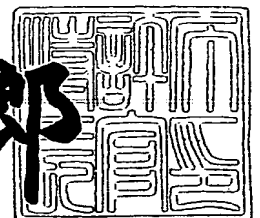
山本 一夫  
住友商事株式会社

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 3月25日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2003-3020616

【書類名】 特許願

【整理番号】 P02-0547

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特  
許出願

【提出日】 平成14年 8月19日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 カーゴレセプターの遺伝子改変による糖鎖ライブラリー

【請求項の数】 13

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都文京区小石川 4 - 1 4 - 2 4 - 2 1 0

    【氏名】 山本 一夫

【発明者】

    【住所又は居所】 鳥取県米子市灘町 3 - 9 6 コーポエコー 1 号室

    【氏名】 佐藤 明

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都西東京市住吉町 2 - 4 - 2 2

    【氏名】 島内 淳子

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県川崎市幸区小倉 1 - 1 - E 2 1 6

    【氏名】 松本 真理子

【特許出願人】

    【住所又は居所】 東京都文京区小石川 4 - 1 4 - 2 4 - 2 1 0

    【氏名又は名称】 山本 一夫

【特許出願人】

    【識別番号】 000002129

    【氏名又は名称】 住友商事株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100118773

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤田 節

【選任した代理人】

【識別番号】 100122389

【弁理士】

【氏名又は名称】 新井 栄一

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 カーゴレセプターの遺伝子改変による糖鎖ライブラリー

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 カーゴレセプターの糖鎖認識部位を改変することにより糖鎖結合タンパク質の糖鎖を改変することを特徴とする、糖鎖結合タンパク質の糖鎖改変方法。

【請求項 2】 カーゴレセプターがVIP36及び／又はERGIC-53である請求項 1 記載の糖鎖改変方法。

【請求項 3】 糖鎖結合タンパク質が膜結合タンパク質又は分泌タンパク質である請求項 1 又は 2 記載の糖鎖改変方法。

【請求項 4】 請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の糖鎖改変方法により糖鎖が改変された糖鎖結合タンパク質。

【請求項 5】 請求項 4 記載の糖鎖結合タンパク質から糖鎖を切断することを中心とする、改変された糖鎖の製造方法。

【請求項 6】 請求項 5 記載の製造方法により製造される改変された糖鎖。

【請求項 7】 カーゴレセプターの糖鎖認識部位を改変することにより糖鎖結合タンパク質の糖鎖を改変することを特徴とする、改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞の作製方法。

【請求項 8】 カーゴレセプターがVIP36及び／又はERGIC-53である請求項 7 記載の作製方法。

【請求項 9】 糖鎖結合タンパク質が膜結合タンパク質又は分泌タンパク質である請求項 7 又は 8 記載の作製方法。

【請求項 10】 請求項 7～9 のいずれか 1 項に記載の作製方法により作製される、改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞。

【請求項 11】 請求項 10 記載の細胞を培養し、得られる培養物から改変型糖鎖結合タンパク質を採取することを特徴とする、改変型糖鎖結合タンパク質の製造方法。

【請求項 12】 カーゴレセプターの糖鎖認識部位にランダム突然変異を導入し、改変された糖鎖を有する糖鎖結合タンパク質を発現させることを特徴とす

る改変型糖鎖ライブラリーの作製方法。

【請求項 1 3】 請求項 1 0 記載の改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞、又は請求項 1 2 記載の作製方法により作製される改変型糖鎖ライブラリーを用いて、糖鎖結合タンパク質又は糖鎖結合タンパク質から切り出した糖鎖をスクリーニングする方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、糖鎖結合タンパク質の糖鎖改変方法、及び糖鎖が改変された糖鎖結合タンパク質に関する。また本発明は、改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞及びその作製方法に関する。さらに本発明は、改変型糖鎖結合タンパク質の製造方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

ヒトゲノムの全塩基配列が明らかになりつつある今日、これら膨大な情報をもとにテーラーメイド医療が始まろうとしている。タンパク質の発現を DNA チップを用いて網羅的に調べる診断法とそのデータに基づく薬物の処方、コンピューター上で行える時代となりつつある。また組換えタンパク質が容易に生成できるようになり、さまざまなサイトカインやホルモンを医薬品として用いることも益々加速されるものと思われる。

【0 0 0 3】

生体内ではさまざまな糖鎖を介した識別のメカニズムがあり、糖鎖は糖タンパク質の輸送や代謝に影響するため、これらタンパク質の生物活性を大きく左右する。また糖鎖の構造変化が癌細胞の異常増殖や転移に関与している可能性が示唆されている。従って、種々のタンパク質を薬剤として用いる場合、遺伝子工学的手法を利用して産生した組換えタンパク質の糖鎖構造を規定し、さまざまなグライコフォームを作り出す技術は、それらに新たな薬効を付与する技術となりうるものと考えられる。例えば、糖鎖構造により糖タンパク質の細胞内における局在場所を決定したり、糖タンパク質の代謝を調節することが可能となる。

## 【0004】

しかしながら糖鎖の付加（グリコシル化）は、その情報が遺伝子に直接コードされていないことから、それを制御する技術はゲノムやプロテオーム研究によっては達成されない。

## 【0005】

糖鎖構造を規定し制御する技術は確立されておらず、現在は各種の糖転移酵素をそれぞれ反応させて糖鎖が合成されている（例えば、特開平11-42096号参照）。この場合、手作業では2～3ヶ月、合成装置を用いても数日を必要とする。また遺伝子工学を利用して糖鎖が付加されたタンパク質を発現させることも行われているが、一般的に用いられる大腸菌はタンパク質に糖鎖を付加することができず、また酵母はヒトとは異なる糖鎖が付加されるため、医薬として有用な糖タンパク質を得ることは困難である。

## 【0006】

一方、医薬分野における糖鎖の要求も増大している。例えば、小児代謝性疾患であるCongenital disorder of glycosylation type Ibなどの疾患においては、欠損する糖鎖を投与することにより治療されている（Science, 291: 2339, 2001）。しかしながら上述したような背景から糖鎖合成は簡便ではなく、糖鎖医薬は高価となっている。

従って、種々の糖鎖を製造し、有用な性質を有する糖鎖が付加されたタンパク質を簡便かつ迅速に検索及び生成する手法が望まれている。

## 【0007】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、簡便かつ迅速な糖鎖改変方法、及び得られる糖鎖結合タンパク質から糖鎖を製造する方法を提供することを目的とする。また本発明は、改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞の作製方法、及び糖鎖ライブラリーを提供することを目的とする。

## 【0008】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記課題を達成するため鋭意検討した結果、細胞内で糖タンパク

質が生合成され選別される過程に糖鎖構造の識別が行われることに着目し、それにかかわるカーゴレセプターの糖鎖認識特異性を改変することにより、発現される糖タンパク質の糖鎖を改変かつ制御することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】

すなわち、本発明は、カーゴレセプターの糖鎖認識部位を改変することにより糖鎖結合タンパク質の糖鎖を改変することを特徴とする、糖鎖結合タンパク質の糖鎖改変方法である。

【0010】

上記糖鎖改変方法において、カーゴレセプターは、VIP36及び／又はERGIC-53であることが好ましい。

また糖鎖結合タンパク質としては、例えば膜結合タンパク質及び分泌タンパク質が挙げられる。

【0011】

本発明はまた、上記糖鎖改変方法により糖鎖が改変された糖鎖結合タンパク質である。

また本発明は、上記糖鎖結合タンパク質から糖鎖を切断することを特徴とする、改変された糖鎖の製造方法である。

さらに本発明は、上記製造方法により製造される改変された糖鎖である。

【0012】

本発明はさらに、カーゴレセプターの糖鎖認識部位を改変することにより糖鎖結合タンパク質の糖鎖を改変することを特徴とする、改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞の作製方法である。

【0013】

上記作製方法において、カーゴレセプターは、VIP36及び／又はERGIC-53であることが好ましい。

また糖鎖結合タンパク質としては、例えば膜結合タンパク質及び分泌タンパク質が挙げられる。

【0014】

本発明はまた、上記作製方法により作製される、改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞である。

また本発明は、上記細胞を培養し、得られる培養物から改変型糖鎖結合タンパク質を採取することを特徴とする、改変型糖鎖結合タンパク質の製造方法である。

#### 【0015】

さらに本発明は、カーゴレセプターの糖鎖認識部位にランダム突然変異を導入し、改変された糖鎖を有する糖鎖結合タンパク質を発現させることを特徴とする改変型糖鎖ライブラリーの作製方法である。

#### 【0016】

またさらに本発明は、上記改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞、又は上記作製方法により作製される改変型糖鎖ライブラリーを用いて、糖鎖結合タンパク質又は糖鎖結合タンパク質から切り出した糖鎖をスクリーニングする方法である。

#### 【0017】

##### 【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、種々の糖鎖を含む糖鎖ライブラリーを構築することを目的として完成されたものである。本発明者らは、真核細胞における分泌経路においてカーゴレセプターが糖タンパク質を認識し、糖鎖修飾に関与していることに注目して研究を行った。それにより、カーゴレセプターの糖鎖認識部位を改変することによって、発現される糖タンパク質の糖鎖を改変することに成功した。

#### 【0018】

##### 1. カーゴレセプター

カーゴレセプター (Cargo receptor) とは、糖タンパク質の品質制御と糖タンパク質のソーティングに重要な役割を果たす動物レクチンの総称である。現在カーゴレセプターとしては、ERからゴルジ体への糖タンパク質の輸送に関わる ERGIC-53 と、ゴルジ体における糖タンパク質の品質制御に関わる VIP36 が知られている (Hauri, H-P, et al., FEBS Letters 476 (2000) 32-37)。



糖タンパク質は、図 1 に示すように、真核細胞内の小胞体（E R）で糖鎖が付加された形態で合成された後、ゴルジ体において糖鎖のプロセッシングを受ける。この分泌経路と呼ばれる過程において、タンパク質は輸送小胞によって細胞内小器官を行き来することにより折りたたまれ、糖鎖が付加され、選別された後、機能すべき部位に向かうよう指定される。この輸送小胞に存在するカーゴレセプターが糖タンパク質の糖鎖を認識し、細胞外に運搬されるタンパク質の選別を行っている。

#### 【 0 0 1 9 】

初期のタンパク質は、まず E R において正確に折りたたまれ、オリゴマー化を受ける。この過程の間にタンパク質はその A s n - X - S e r / T h r ペプチド配列（X はプロリン以外の任意のアミノ酸を表す）に糖鎖が付加される（Kornfeld R and Kornfelds Ann Rev Biochem, 1985, 54:631-664）。この脂質中間体から転移したオリゴ糖は、マンノース、グルコース及び N - アセチルグルコサミン（G l c N A c）からなる 1 4 個の糖単位を含むものである。細胞内の中心部では、糖タンパク質の糖部分（例えば最も外側にあるグルコース残基）がレクチンにより認識されて、正しく折りたたまれたタンパク質のみがそのグルコース残基を除去されてさらなる修飾のためにゴルジ体に運ばれる（Teasdale RD, and Jackson MR, Annu Rev Cell Dev Biol, 1996, 12:27-54）。

#### 【 0 0 2 0 】

続いて、E R とゴルジ体の間の区画（ER-Glogi intermediate compartment: E R G I C）においては、E R G I C - 5 3 が E R から E R G I C への糖タンパク質の輸送において機能する。またゴルジ体においては、種々の糖転移酵素とグリコシダーゼによって糖鎖の修飾がさらに行われ、これにより主に G l c N A c、ガラクトース、フコース、シアル酸などのより精巧なオリゴ糖が形成される。しかしながら、この修飾過程においては常に完全な糖鎖が形成されるわけではなく、生理的に機能しないと考えられる糖タンパク質も生成される。V I P 3 6 は、このような糖鎖修飾過程において形成される糖鎖の品質管理に機能を果たし、糖タンパク質のトランスゴルジ体からシスゴルジ体又は E R G I C との間の輸送に関与していると考えられている（Fullekrug J, J Cell Sci, 1999, 112 ( Pt

17): 2813-21)。VIP36は、不完全な糖タンパク質をERGIC又はシスゴルジ体における糖鎖修飾の初期段階に戻すことにより、不完全な糖タンパク質が分泌されないようにする。

#### 【0021】

上述したように、本発明において「カーゴレセプター」とは、糖鎖の修飾過程において糖タンパク質の糖鎖を認識し、生体内で必要とされる糖タンパク質の運搬に関与するものであれば特に限定されるものではなく、現在発見されているERGIC-53及びVIP36以外にも、今後発見されるであろう同様の機能を有するカーゴレセプターも本発明の範囲に包含される。

#### 【0022】

現在発見されている2種のカーゴレセプターは既に単離されており、ERGIC-53については、ヒトERGIC-53がGenBankアクセッション番号X71661として登録されている。またこの塩基配列を配列番号1に、アミノ酸配列を配列番号2に示す。またVIP36に関しては、ヒトGP36b糖タンパク質がGenBankアクセッション番号U10362として（塩基配列を配列番号3に、アミノ酸配列を配列番号4に示す）、イヌ（*C. familiaris*）VIP36がGenBankアクセッション番号X76392として登録されている。

#### 【0023】

カーゴレセプターは、その中央部分に糖鎖を認識して糖タンパク質と結合する「糖鎖認識部位」（CRDとも呼ばれる）を有することが知られている（Hauri, H-P. et al., Journal of Cell Science, 113:587-596, 2000）。本発明者は、カーゴレセプターの糖鎖認識部位を改変することによって、細胞内においてカーゴレセプターにより認識される糖鎖が変更され、それにより糖鎖修飾過程が変化した結果、糖タンパク質として膜表面上に発現される又は細胞外に分泌されるタンパク質の糖鎖を改変できることを見出した。以下に、本発明に係る糖鎖改変方法と改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞の作製方法について説明する。

#### 【0024】

### 2. カーゴレセプターの糖鎖認識部位の改変

## (1) 糖鎖認識部位

本発明者は、マメ科レクチンとの相同性比較を行うことにより、カーゴレセプターの糖鎖認識部位の中で、特に糖鎖に対する特異性を決定するために重要な糖鎖認識決定部位を特定した。推定糖鎖認識決定部位は、ヒト E R G I C - 5 3 の塩基配列（配列番号 1、翻訳開始の a t g の a を 1 とする）の 4 5 4 ~ 4 8 0 塩基、またアミノ酸配列（配列番号 2）の 1 5 2 (A s p) ~ 1 6 0 (L y s) 番目に相当する。ヒト V I P 3 6 の推定糖鎖認識決定部位は、塩基配列（配列番号 3）の 4 8 4 ~ 5 1 0 塩基、またアミノ酸配列（配列番号 4）の 1 6 2 (A s p) ~ 1 7 0 (T h r) 番目に相当する。ヒト以外のカーゴレセプターも、ヒトカーゴレセプターとの相同性から糖鎖認識決定部位を推定することが可能である。

## 【 0 0 2 5 】

本発明は、カーゴレセプターの糖鎖認識部位、特に糖鎖認識決定部位を改変することを特徴とする。本発明において「糖鎖認識部位の改変」とは、カーゴレセプターがタンパク質として発現された際に、その糖鎖認識部位又は糖鎖認識決定部位が改変前のものと比較して配列及び／又は構造が異なることを意味する。

## 【 0 0 2 6 】

糖鎖認識部位を変異導入により改変する場合、糖鎖認識部位を構成するアミノ酸において、アスパラギン酸 (A s p) は C a 及び M n に配位するアミノ酸として、アスパラギン (A s n) は側鎖が糖との協同的水素結合を形成し、C a に配位結合するアミノ酸として重要であり、カーゴレセプターの構造保持及び糖との結合親和性に大きく関与していると考えられるため、上記推定した 9 アミノ酸の糖鎖認識決定部位のうち、E R G I C - 5 3 ではアミノ酸 1 5 2 (A s p) と 1 5 6 (A s n)、V I P 3 6 ではアミノ酸 1 6 2 (A s p) と 1 6 6 (A s n) を保存し、変異を導入しないことが好ましい。

## 【 0 0 2 7 】

## (2) 糖鎖認識部位へのランダム変異導入

本発明においては、カーゴレセプターの糖鎖認識部位（又は糖鎖認識決定部位）の改変をその遺伝子への変異導入により行うことが好ましい。遺伝子の一部の領域に変異を導入して遺伝子を改変する手法は当技術分野では周知である。導入

される変異と改変される糖鎖との間の相関がわからない場合には、カーゴレセプターの糖鎖認識部位をランダムに変異させ、発現される糖タンパク質の糖鎖が改変されるかどうかを確認する。

#### 【0028】

遺伝子の一部の領域にランダムに突然変異を導入するには、当技術分野で公知のランダム突然変異誘発法を採用することができる。そのような手法としては、限定されるものではないが、縮重オリゴヌクレオチド法、リンカースキャニング法、PCRに基づく方法などが挙げられる。これらの手法に関しては、例えば「分子生物学実験プロトコールⅠ」Ausubel, FMら著、西郷薫及び佐野弓子訳、1997年、丸善株式会社（特に第8章）、「新 遺伝子工学ハンドブック」改訂第3版、村松正實及び山本雅編、1999年、株式会社羊土社（特に第216～226頁）などを参照されたい。本発明においては、可能な限り多種類のランダムなオリゴヌクレオチドを大量に調製するという目的を達成するために、縮重オリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR法）と組み合わせてランダムな変異を導入する手法が好ましい。縮重オリゴヌクレオチドを用いてPCR法によりカーゴレセプターの糖鎖認識部位を改変する手法について以下に詳細に説明する。

#### 【0029】

##### （2-1）原理

縮重オリゴヌクレオチド法は、オリゴヌクレオチド合成時に正常塩基以外の塩基を混入することによりランダム変異が挿入された縮重オリゴヌクレオチドを合成することができるという事象に基づいている。この手法を利用することにより、カーゴレセプターの糖鎖認識部位に相当する領域について多様な変異が導入された縮重オリゴヌクレオチドを得ることができる。縮重オリゴヌクレオチド法は、1塩基当たり10%突然変異率を得るために90%の正常塩基に各3.33%の他の3塩基を混入するなど、混入比率を増減させることにより突然変異率を制御できるという利点がある。

#### 【0030】

縮重オリゴヌクレオチドを作製するためのキットも多数市販されており、例え

ば、ExSite<sup>TM</sup>PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Kit (S t r a t a g e n e)、LA PCR<sup>TM</sup> in vitro Mutagenesisキット (T a K a R a) などを用いることができる。このようなキットを利用した場合、プライマーの設計を変更することにより、点突然変異、数塩基の欠失・挿入など、多様な変異体を簡便に作製することが可能である。

#### 【 0 0 3 1 】

##### ( 2 - 2 ) ランダムライブラリーの作製

最初に、多様な変異を有する糖鎖認識部位を含むカーゴレセプター遺伝子を得るために、上述した縮重オリゴヌクレオチドからなるランダムプライマーを用いて、ランダムに変異が導入された糖鎖認識部位を含むカーゴレセプター遺伝子のランダムライブラリーを作製する。

#### 【 0 0 3 2 】

ランダムプライマーとしては、糖鎖認識部位の周辺の領域にハイブリダイズする縮重オリゴヌクレオチドを用いる。ランダムプライマーの設計方法は、当技術分野で公知であり、PCR反応条件などと共に当業者であれば容易に決定することができる。

#### 【 0 0 3 3 】

以下のものに限定されるものではないが、本発明において利用可能なランダムプライマーを以下に示す：

・ V I P 3 6 の糖鎖認識部位を含む 3' 末端側の後半断片を増幅するためのプライマー

V I P r a n 3 : 5'-CGT GCT CTA GAC NNK NNK NNK AAT NNK NNK NNK NNK GAG CGC GTG TTC CCG TA-3'、(配列番号 7 : 配列中、NはA/T/G/C、KはG/Tを表す)

V I P r a n 5 : 5'-ATC GTC TTA AGC ACT CAG TAG AAG CGC TTG-3' (配列番号 8)

・ E R G I C - 5 3 の糖鎖認識部位を含む 3' 末端側の後半断片を増幅するためのプライマー

E R G I C - B F : 5'-CGTATCTAGATXXXXXXXXXXKAATXXXXXXXXXXKAATAATCCTGCTAT

AGTAATTAT-3' (配列番号 1 4 : 配列中、KはG若しくはT、XはA、T、G、Cのいずれかを表す)

ERGIC-BR : 5' -CGTACTTAAGTGGTAGTCAAAAGAATTTTTTG-3' (配列番号 1 5)

#### 【 0 0 3 4 】

上述のように設計したプライマーの合成法は、当技術分野で周知である。例えば、ホスホアミダイト法などの一般的なオリゴヌクレオチド合成法を用いることができる。

#### 【 0 0 3 5 】

続いて、上記設計したプライマーを用いて、カーゴレセプター cDNA 又は cDNA ライブラリー若しくは mRNA を鋳型として増幅反応を行う。増幅反応としては、限定するものではないが、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、LAMP 法 (Loop-mediated Isothermal Amplification) などが挙げられる。mRNA の抽出及び cDNA ライブラリーの作製は常法に従って行うことができる。

#### 【 0 0 3 6 】

このようにして得られた mRNA を鋳型として、ランダムプライマーと共に逆転写酵素を用いて一本鎖 DNA を合成した後、該一本鎖 DNA から二本鎖 DNA を合成する。PCR 法の場合は二本鎖 DNA が得られる。次に、得られた二本鎖 DNA を適当なクローニングベクターに組み込んで組換えベクターを作製する。そしてこの組換えベクターを用いて大腸菌等を形質転換し、テトラサイクリン耐性、アンピシリン耐性等を指標として形質転換体を選択することにより、ランダムライブラリーを得ることができる。

#### 【 0 0 3 7 】

次に、得られたクローンから目的のカーゴレセプター遺伝子を含む部分をクローニングする。DNA のクローニングには、例えば TA クローニング法が用いられる。TA クローニング法は、市販のキット、例えば Invitrogen 社製の TA クローニングキットを用いて行うことができる。

#### 【 0 0 3 8 】

上記スクリーニングにおいて得られた DNA の単離クローンについて、増幅産

物をテンプレートにしてDNAの塩基配列を決定する。

【 0 0 3 9 】

塩基配列の決定はマキシムーギルバートの化学修飾法、又はM13ファージを用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法等の公知手法により行うことができるが、通常は自動塩基配列決定装置（例えばL I - C O R 社製DNA Sequencer LONG R EADER 4200等）を用いて配列決定が行われる。

【 0 0 4 0 】

上述した以外にも、カーゴレセプター遺伝子の塩基配列を基にして、当該塩基配列から1～数個の塩基の欠失、置換若しくは挿入を人為的に行う技術、例えば部位特異的突然変異誘発法により、カーゴレセプターとしての機能を維持させつつ糖鎖認識部位の配列の異なる変異体を作製することができる。例えば1～数個の塩基が置換されるような部位特異的突然変異誘発については、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81(1984) 5662-5666 ; W085/00817号公報 ; Nature 316(1985) 601-605 ; Gene 34(1985) 315-323 ; Nucleic Acids Res. 13(1985) 4431-4442 ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79(1982) 6409-6413 ; Science 224(1984) 1431-1433等に記載の技術に従って変異体を取得し、これを利用することができる。また、市販のキット（Mut a n - G、Mut a n - K（T a k a r a））を用いてこれらの変異体を作製することができる。さらに、誤りを起こしやすいポリメラーゼ連鎖反応（error-prone PCR）もまた変異体作製方法として知られており、複製の厳密度の低い条件を選択することによって1～数塩基の変異を導入することができる（Cadwell, R.C. and Joyce, G.F. PCR Methods and Applications 2(1992) 28-33 ; Malboeuf, C.M. et al. Biotechniques 30(2001) 1074-8 ; Moore, G. L. and Maranas C.D. J. Theor. Biol. 7; 205 (2000) 483-503）。

【 0 0 4 1 】

ランダム突然変異は、例えばV I P 3 6の糖鎖認識部位に相当する、14ヌクレオチドがA、T、G又はCのいずれかであり、7ヌクレオチドがG又はTのいずれかであるため、ランダムに変異導入された配列には、少なくとも $4^{14} \times 2^7$ （すなわち $3.4 \times 10^{10}$ ）の組合せが可能である。また例えばE R G I C - 53の糖鎖認識部位に相当する9アミノ酸のうち7アミノ酸に変異を導入すること

が可能であり、従って、14ヌクレオチドがA、T、G又はCのいずれがであり、7ヌクレオチドがG又はTのいずれかであるため、ランダムに変異導入された配列には、VIP36と同様に、少なくとも $4^{14} \times 2^7$  (すなわち $3.4 \times 10^{10}$ )の組合せがある。さらに、欠失・挿入などの変異を導入することによって、ランダムライブラリーには多様な配列がより多く含まれることになる。

#### 【0042】

##### (2-3) ランダムベクター

上述のようにして得た多様な変異を有する糖鎖認識部位を含むカーゴレセプター遺伝子のランダムライブラリーを用いて、細胞をトランスフェクトするためのベクターを作製する。

#### 【0043】

細胞にトランスフェクトするためのランダムベクターは、上記ランダムライブラリーのDNAを適当なベクターに連結することにより得ることができ、トランスフェクト細胞は、上記ランダムベクターを、目的のカーゴレセプター遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することにより得ることができる。

#### 【0044】

ベクターとしては、トランスフェクション用のベクターとして当技術分野で公知のベクターが使用され、例えば、プラスミドDNA、ファージDNA、レトロウイルス又はワクシニアウイルスなどの動物ウイルスベクター、バキュロウイルスなどの昆虫ウイルスベクター、細菌人工染色体(BAC)、酵母人工染色体(YAC)などが挙げられる。

#### 【0045】

ベクターにランダムライブラリーのカーゴレセプター遺伝子を挿入するには、まず、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、適当なベクターDNAの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法などが採用される。

#### 【0046】

カーゴレセプター遺伝子は、その遺伝子の機能が発揮されるようにベクターに組み込まれることが必要である。そこで、組換えベクターには、プロモーター、



カーゴレセプター遺伝子のほか、所望によりエンハンサーなどのシスエレメント、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、リボソーム結合配列（SD配列）などを連結することができる。なお、選択マーカーとしては、例えばジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等が挙げられる。

## 【 0 0 4 7 】

DNA断片とベクター断片とを連結させるには、公知のDNAリガーゼを用いる。そして、DNA断片とベクター断片とをアニーリングさせた後に連結させ、ランダムベクターを作製する。

## 【 0 0 4 8 】

## ( 2 - 4 ) 細胞へのトランスフェクション

トランスフェクションに使用する宿主としては、真核細胞であれば特に限定されるものではない。例えば、酵母、動物細胞（COS細胞、CHO細胞、MDCK細胞等）、昆虫細胞などが挙げられる。本発明においては、特に動物細胞を用いることが好ましい。

## 【 0 0 4 9 】

酵母を宿主細胞とする場合は、例えばサッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、シゾサッカロミセス・ポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）などが用いられる。この場合、プロモーターは酵母中で発現できるものであれば特に限定されない。酵母への組換えベクターの導入方法は、酵母にDNAを導入する方法であれば特に限定されず、例えばエレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等が挙げられる。

## 【 0 0 5 0 】

動物細胞を宿主とする場合は、サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）、マウスL細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞、Mardin Darbyイヌ腎細胞（MDCK細胞）等が用いられる。プロモーターとしてはSR $\alpha$ プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター等が用いられ、また、ヒトサイトメガロウイルスの初期遺伝子プロモーター等を用いてもよい。動物細胞への組換えベクターの導入

方法としては、例えばエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等が挙げられる。動物細胞へのベクター導入方法は、市販のキット、例えばEffectene(登録商標)トランスフェクション試薬(QIAGEN)、LipofectAMINE試薬(Invitrogen)を製造業者のプロトコールに従って用いることにより簡便に行うことができる。

#### 【0051】

昆虫細胞を宿主とする場合は、Sf9細胞などが用いられる。昆虫細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばリン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法などが挙げられる。

#### 【0052】

トランスフェクト細胞は、導入する遺伝子内に構成されるマーカー遺伝子の性質を利用して選択される。例えば、ネオマイシン耐性遺伝子を用いた場合には、G418薬剤に抵抗性を示す細胞を選択する。

#### 【0053】

目的のカーゴレセプター遺伝子が細胞に組み込まれたか否かの確認は、PCR法、サザンハイブリダイゼーション法などにより行うことができる。例えば、トランスフェクト細胞からDNA又はmRNAを調製し、導入DNA特異的プライマーを設計してPCRを行う。その後、増幅産物についてアガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動又はキャピラリー電気泳動などを行い、臭化エチジウム、SYBR Green液などにより染色し、そして増幅産物を1本のバンドとして検出することにより、導入DNAを確認することができる。また、予め蛍光色素などにより標識したプライマーを用いてPCRを行い、増幅産物を検出することもできる。さらに、マイクロプレートなどの固相に増幅産物を結合させ、蛍光又は酵素反応などにより増幅産物を確認する方法も採用することができる。

#### 【0054】

### (3) 分離

上述のとおりカーゴレセプターの糖鎖認識部位を改変した後、特定の改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞は、その糖鎖に基づいて分離することができる

特定の糖鎖に基づいてトランスフェクト細胞を分離する方法としては、当技術分野で公知の糖鎖識別手法に基づくものであれば特に限定されるものではない。本発明においては、その簡便な点から、糖鎖結合特異性を有する複数種の植物レクチンを利用してトランスフェクト細胞の細胞表面上で発現されている糖鎖結合タンパク質の糖鎖を識別し、細胞を分離することが好ましい。

## 【 0 0 5 5 】

植物レクチンとしては、マッシュルーム（A B A）レクチン、タチナタマメ（C o n A）レクチン、洋種チョウセンアサガオ（D S A）レクチン、レンズマメ（L C A）レクチン、ミヤコグサ（L o t u s）レクチン、イヌエンジュマメ（M A M）レクチン、ホモ四量体Eーサブユニットを持つインゲンマメレクチン（P H A - E<sub>4</sub>）、ホモ四量体Lーサブユニットを持つインゲンマメレクチン（P H A - L<sub>4</sub>）、ヒママメ（R C A 1 2 0）レクチン、及びコムギ胚芽（W G A）レクチンなどが挙げられる。

植物レクチンに関しては詳細な研究が行われており、例えば下記表 1 に示すように、その糖特異性が正確に解析されている。

## 【 0 0 5 6 】

【表 1】

レクチン	糖特異性	糖鎖の種類
ABA	D-Gal	O-linked
ConA	$\alpha$ -D-Man, $\alpha$ -D-Glc	N-linked
DSA	$\beta$ -D-GlcNAc, ( $\beta$ 1-4GlcNAc) <sub>n</sub>	
LCA	$\alpha$ -D-Glc, $\alpha$ -D-Man	N-linked
Lotus	$\alpha$ -L-Fuc	
MAM	SA $\alpha$ 2' 3Gal	N- or O-linked
PHA-E <sub>4</sub>	D-GalNAc	N-linked
PHA-L <sub>4</sub>	D-GalNAc	N-linked
RCA120	$\beta$ -D-Gal	N- or O-linked
WGA	D-GlcNAc (bisecting)	N- or O-linked

## 【0057】

植物レクチンは、例えばビオチン標識レクチンとして、B i o t i n - L e c t i n s e t I、II（ホーネンコーポレーション）が市販されている。

植物レクチンと糖鎖との研究に関しては、ホーネンコーポレーションのホームページにおいて、糖鎖分析プロトコル・レクチン関連情報として、表1に記載した以外の植物レクチン、それらの糖特異性、糖タンパク質精製手法などが掲載されている（<http://www.honen.co.jp/finechem/>参照）。

## 【0058】

上記植物レクチンの糖特異性を利用して、改変された糖鎖の種類を決定することができる。特定の植物レクチンと結合した糖鎖を有する細胞を検出する方法は、当技術分野で公知の手法であれば特に限定されず、例えば、標識した植物レクチンを検出する手法などにより行うことができる。

## 【0059】

好ましくは、標識した植物レクチンと結合した糖鎖を有する細胞を分離するために、磁気ビーズを用いて2次標識し、その磁性を利用して細胞を分離する手法、また標識の情報に基づいてフローサイトメトリーにより分取する手法を採用す

ることができる。

【0060】

### 3. 改変部位と改変型糖鎖の確認

上述のようにして、カーゴレセプターの糖鎖認識部位にランダムに変異を導入し、得られた糖鎖結合タンパク質の糖鎖構造を調べることにより、改変部位と改変型糖鎖との相関関係を知ることができる。

従って、特定の改変型糖鎖を得るために特定の改変を行う場合には、カーゴレセプターの糖鎖認識部位に部位特異的に変異を導入する。そのような手法としては、Kunkel法、Gapped duplex法などの公知の手法又はこれに準ずる方法を採用することができる。例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット（例えばMut an-K（TAKARA社製）やMur an-G（TAKARA社製））などを用いて簡便に変異を導入することができる。

上述のようにカーゴレセプターの糖鎖認識部位に特定の変異を導入することによって、所望の改変型糖鎖を有するタンパク質を細胞において発現させ、簡便に大量の改変型糖鎖を得ることが可能となる。

【0061】

### 4. 改変型糖鎖を有する糖鎖結合タンパク質を発現する細胞の作製

上述のように、変異部位と改変型糖鎖との相関が決定された場合には、特定の改変型糖鎖を有する糖鎖結合タンパク質を発現する細胞を作製することができる。本発明において「改変された糖鎖」又は「改変型糖鎖」とは、カーゴレセプターを改変する前の糖鎖と比較してその配列及び／又は構造が異なるものを指す。また本発明において「糖タンパク質」又は「糖鎖結合タンパク質」とは、糖とタンパク質から構成され、それらが共有結合している物質を指す。

【0062】

特定の改変型糖鎖を結合させようとするタンパク質は、慣例的な遺伝子工学的手法により、上記作製した細胞において発現させ、糖鎖を結合させることができる。そのようなタンパク質としては、以下に限定するものではないが、医薬品として使用するタンパク質、例えば、エリスロポエチン（EPO）、顆粒球コロニ

一刺激因子 (G-CSF)、インターロイキン、抗体などが挙げられる。EPO は、糖鎖を改変することにより当該タンパク質の血中半減期が延長することが既に報告されている。従って、糖鎖改変によって、タンパク質が有する性質 (効果) と同じ効果若しくはそれ以上の効果、又はその他の医薬上有用な性質 (効果) をタンパク質に付与することができる可能性がある。また特定の改変型糖鎖を結合させようとするタンパク質は医薬用タンパク質に限定されるものではなく、例えば生体内における糖鎖の影響を研究するための対象となるタンパク質、細胞間認識に関わるT細胞レセプター、NK細胞レセプター、ケモカインレセプター、MHCクラスI、II分子、接着分子であるNCAM、カドヘリン、インテグリン、LFA-1、ICAM-1、GlyCAM-1、発生に関わるアクチビン、Notch、Delta、Serrate、細胞外マトリクスであるムチン、コラーゲンなども本発明に包含される。

#### 【0063】

上記作製した細胞において所望のタンパク質を発現させるには、例えば、「2. カーゴレセプターの糖鎖認識部位の改変」の項の(2-3)及び(2-4)に記載のように、当該タンパク質をコードする遺伝子を組換えベクターに挿入し、そのベクターを細胞に形質転換又はトランスフェクトする。その際、当該タンパク質を膜結合タンパク質として発現させようとする場合には、タンパク質をコードする遺伝子の他、細胞表層にタンパク質を輸送させる分泌シグナル配列及び細胞表層局在タンパク質の膜貫通ドメイン又はGP Iアンカー結合配列を同一の遺伝子上にコードする融合遺伝子を構築し、その融合遺伝子を細胞において発現させる。また、当該タンパク質を分泌タンパク質として発現させようとする場合には、タンパク質をコードする遺伝子と分泌シグナル配列を同一の遺伝子上にコードする融合遺伝子を構築し、その融合遺伝子を細胞において発現させる。

#### 【0064】

分泌シグナル配列 (分泌シグナル又は分泌シグナルペプチドともいう) は、一般に細胞外に分泌されるタンパク質のN末端に結合している。通常、細胞外に分泌されるタンパク質が細胞内から細胞膜を通過して細胞外へ分泌される際に除去される。本発明においては、所望のタンパク質を細胞外に移動及び発現させるこ

とができる分泌シグナル配列であれば、いずれのものも使用することができる。

【 0 0 6 5 】

細胞表層局在タンパク質は、宿主細胞の細胞表層に固定され、細胞表層に存在するタンパク質をいう。細胞表層とは、宿主細胞の最も外側の膜（例えば細胞壁、細胞膜など）の内部、細胞膜の最外層と外界との境界面、及び細胞の最外層からリンカー又はアンカーを介して突き出た領域のいずれをも意味する。細胞表層局在タンパク質としては、所望のタンパク質を細胞表層に固定化可能なものであれば特に限定されない。

【 0 0 6 6 】

本発明に係る改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞を用いて所望のタンパク質を発現させた場合には、当該タンパク質に改変型糖鎖が付加される。従って、本発明により、特定の糖鎖を所望のタンパク質に結合させることが可能である。

【 0 0 6 7 】

5. 改変型糖鎖結合タンパク質

本発明においては、上記「2. カーゴレセプターの糖鎖認識部位のランダム変異導入」又は「4. 改変型糖鎖を有する糖鎖結合タンパク質を発現する細胞の作製」の項に記載のようにして作製された細胞を用いて、改変型糖鎖結合タンパク質を製造することが可能である。

【 0 0 6 8 】

本発明において、改変型糖鎖結合タンパク質は、上記作製した細胞を培養し、その培養物から採取することにより得ることができる。「培養物」とは、培養細胞又は細胞の破砕物のいずれをも意味するものである。トランスフェクトした細胞を培地に培養する方法は、宿主細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

【 0 0 6 9 】

酵母等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含み、形質転換体の培養を効率的に行うことができる培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いても

よい。ここで、培地に添加される炭素源、窒素源、無機物などについては当技術分野で公知である。

#### 【0070】

培養は、通常、振盪培養又は通気攪拌培養などの好氣的条件下、約28～40℃で約18時間～10日間行う。培養期間中、pHは中性付近、例えばpH7.4に保持する。pHの調整は、無機又は有機酸、アルカリ溶液等を用いて行う。培養中は必要に応じてアンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

#### 【0071】

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、Lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトシド (IPTG) 等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドール酢酸 (IAA) 等を培地に添加してもよい。

#### 【0072】

動物細胞を宿主細胞として得られたトランスフェクト細胞を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI 1640培地、DMEM培地、HAM F10培地などに5～20%ウシ胎児血清を添加したもの、あるいは市販の種々の無血清培地などが用いられる。培養は、通常、5%CO<sub>2</sub>存在下、37℃で約18時間から10日間行う。培養中は必要に応じてカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

#### 【0073】

培養後、目的の改変型糖鎖結合タンパク質は、通常のタンパク質精製手段等を用いて得ることができる。当該タンパク質が膜結合タンパク質である場合には細胞表面上に生産されるため、細胞を破碎することによりタンパク質を抽出する。また当該タンパク質が分泌タンパク質である場合には、培養上清からタンパク質を採取する。その後、タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマト



グラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独で又は適宜組み合わせて用いることにより、前記培養物中から目的のタンパク質を単離精製することができる。

目的のタンパク質が得られたか否かは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動等により確認することができる。

【0074】

## 6. 糖鎖の製造

上述のように改変型糖鎖結合タンパク質を得た後、当該タンパク質から糖鎖を切断することにより、改変された糖鎖を得ることができる。糖鎖の切断は、ヒドラジン分解法、酵素による分解など、当技術分野で公知の手法により行うことができる。ヒドラジン分解法については、ヒドラクラブヒドラジン分解試薬C（ホーネンコーポレーション）が市販されており、取扱説明書に従って糖鎖を切断することができる。また酵素による分解は、例えば、N-グリコペプチダーゼ、O-グリカナーゼを糖鎖結合タンパク質と反応させることにより、糖鎖を切断することができる。

【0075】

本発明により、改変された糖鎖を簡便かつ大量に製造することができる。糖鎖は、生物及び化学分野を含む多くの分野で必要とされているが、その製造に時間的及び経済的にコストがかかっていた。本発明は、そのような糖鎖を必要とするあらゆる分野において非常に有用である。

【0076】

## 7. 糖鎖ライブラリー

上記（2-2）で示したように、カーゴレセプターにランダムに変異を導入した配列を含むランダムライブラリーは、非常に大きなものである。従って、このカーゴレセプターのランダムライブラリーを用いて細胞をトランスフェクトすることにより、細胞表面上に改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞のライブラリーを作製することができる。

【0077】

糖鎖の構造は生体内の機能に関与していると考えられるため、糖鎖を研究する

上で本糖鎖ライブラリーは有用である。例えば、種々の糖鎖を含む糖鎖ライブラリーの中から重要な機能を有する糖鎖を検索することが可能となる。

#### 【0078】

本糖鎖ライブラリーから特定の構造又は機能を有する糖鎖を選択するには、例えば、植物レクチン、抗体、レセプターに対する結合性により選別する手法、*in vivo*において、放射性標識した細胞を器官集積性（ターゲティング）について選別する手法などを用いることができる。

#### 【0079】

また本糖鎖ライブラリーは、多種多様な糖鎖結合タンパク質を発現する細胞をチップ上に固定化して用いることも可能であり、そのようなチップは、特定の構造又は機能を有する糖鎖を検出するために有用である。逆に、糖鎖ライブラリーをそれぞれ種々の蛍光ビーズ（Luminox社）又はチップ上に固定化して用いることも可能であり、そのような蛍光ビーズ又はチップは特定の糖鎖構造を認識するタンパク質等の物質の網羅的検出（スクリーニング）に有用である。本発明において「スクリーニング」とは、特定の糖鎖構造を認識する物質の候補を選択する工程を意味し、無数の被検物質をふるい分けて候補物質を絞り込むことを指す。

#### 【0080】

##### 【実施例】

本発明を以下の実施例により具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

##### 【実施例1】VIP36ランダムライブラリーの作製

##### （1）プラスミドpRc／CMV2-flag-VIPh-AflII

本実施例においては、図2に示すようにVIP36の糖鎖認識決定部位をコードしているcDNA部分にランダム突然変異を導入するため、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行って増幅されるcDNA断片（VIPtと呼ぶ。全長1407ヌクレオチドのうち481から1071までのヌクレオチド）にランダムに突然変異が導入された糖鎖認識決定部位が含まれるように、糖鎖認識決定部位をコードしているcDNAと重複するランダム化オリゴヌクレオチドとして、下記の

プライマーを設計した。

【0081】

VIP36ランダムライブラリーを構築するために下記の4つのプライマーを用いた。すなわち、VIPran1: 5'-GCA TGT CGA CAT AAC TGA CGG CAA CAG TG-3' (配列番号5: ヌクレオチドの5' 末端に制限酵素認識決定部位HincII: GTC GACを含む)、VIPran2: 5'-GAG CTC TAG AAA GAT GGC TAA GC C GTG GAA-3' (配列番号6: 5' 末端にXbaI部位: TCT AGAを持つ)、VIPran3: 5'-CGT GCT CTA GAC NNK NNK NNK AAT NNK NNK NNK NNK GAG CGC G TG TTC CCG TA-3'、(配列番号7: 配列中、NはA/T/G/Cの、KはG/Tの混合物であり、5' 末端にXbaI部位を持つ)、及びVIPran5: 5'-A TC GTC TTA AGC ACT CAG TAG AAG CGC TTG-3' (配列番号8: 5' 末端にBfrI部位: CTT AAGを持つ)。

【0082】

VIPran1及びVIPran2プライマーはVIP36遺伝子の5' 末端側半分(VIPh断片、全長1407のうち133-480ヌクレオチド)を構築するためのPCRに用いた。最初に、プライマーを10 $\mu$ lのVIPran1 (2 $\mu$ g/ $\mu$ l)、10 $\mu$ lのVIPran2 (2 $\mu$ g/ $\mu$ l)、2 $\mu$ lの10 $\times$ Kination buffer A、1.5 $\mu$ lの10mM ATP、6 $\mu$ lの水、1.5 $\mu$ lのT4キナーゼの混合物中で、リン酸化した。溶液は37℃で2時間保温した。PCRは、1.5 $\mu$ lの各リン酸化プライマー、5 $\mu$ lの10 $\times$ KOD plus buffer (TOYOBO)、2 $\mu$ lのMgSO<sub>4</sub> (TOYOBO)、2 $\mu$ lの2mM dNTP混合物、2 $\mu$ lのpBluescript-VIP36 (鋳型として、10ng/ $\mu$ l)、3.5 $\mu$ lの水、及び1 $\mu$ lのKOD plus (TOYOBO) からなる反応溶液で行った。PCRプログラムはPCRexpress (Hybaid) 又はGeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer) のいずれかで行い、94℃2分間で開始、次いで94℃20秒、52℃30秒、68℃1分間を30サイクル行い、その後68℃で5分間ホールドとした。

【0083】

増幅されたVIPh断片を1%アガロースゲル電気泳動によって回収し、次いでゲル抽出(QIAquick Gel Extraction Kit, Qia gen)を行い、TEバッファー中に保存した。Sma I消化に次いでアルカリホスファターゼ処理を行った後、VIPh断片をpBluescript (pBluescript SK(+)(Stratagene))と15℃で一晩ライゲーションした。このように調製された混合物を、ヒートショック法によってCaCl<sub>2</sub>処理した大腸菌JM109株に形質転換し、色で選抜するために50  $\mu$ lの5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -ガラクトシド(X-gal)と4  $\mu$ lのイソプロピル-1-チオ- $\beta$ -ガラクトシド(IPTG)とともにLB-Ampプレート上で一晩培養した。白色のコロニーを選抜し、100  $\mu$ g/mlのアンプシリン存在下でのLB培地(LB-Amp培地)中で一晩培養した。Plasmid Mini Kit(QIAGEN)を用いて、一晩培養した培地からプラスミドDNAを抽出し、TEバッファー中に保存した。その後、PBS-VIPhベクターを、VIPh断片を含むpBluescriptのHinc II及びNot Iで消化して得た。消化したVIPh断片(それぞれの末端がHinc II及びNot Iで切断され3'末端にいくつかのpBluescriptヌクレオチドを持つVIPh')を、QIAquick Gel Extraction Kitを用いて抽出し、TEバッファー中に保存した。VIPh'断片を、Hpa I及びNot I(Hpa I部位及びNot I部位はそれぞれflagタグ付きpRc/CMV2に存在する)で消化されたpRc/CMV2-flagと15℃で一晩ライゲーションした。pRc/CMV2-flag(5641bp)は、flag配列5'-GAC TAC AAA GAC GAT GAC GAC AAG-3'(配列番号9)がpRc/CMV2のHinc II(5641bpのうち1981塩基対)及びHpa I制限酵素認識部位の間に挿入された改変pRc/CMV2(カタログ番号V750-20, Invitrogen)である。ライゲーションされた混合物を大腸菌に形質転換し、37℃で一晩LB-Amp寒天プレート上で培養した。4つのコロニーを選抜し、それぞれ37℃で一晩LB-Amp培地中で培養した。その後、Plasmid Mini Kitを用いて回収したpRc/CMV2-flag-VIPhを配列決定した。

## 【0084】

pRc/CMV2-flag-VIPhの配列決定は、0.75  $\mu$ lのpRc/CMV2F（フォワードダイプライマー）、0.75  $\mu$ lのpRc/CMV2R（リバースダイプライマー）及び0.5  $\mu$ lの25mM dNTP、1  $\mu$ lのThermosequense<sup>TM</sup>（usb）、1  $\mu$ lのThermosequense<sup>TM</sup>反応バッファー（usb）、1.5  $\mu$ lのpRc/CMV2-flag-VIPh及び1.5  $\mu$ lの水を含む、全8.5  $\mu$ lの溶液によるダイデオキシ法を適用した。その後、16  $\mu$ lの混合物をそれぞれ4つの0.2mlチューブに加え、それぞれ同量（16  $\mu$ l）のddATP、ddTTP、ddGDP、及びddCTPを加えた。PCRは混合液を用いて、標準的な方法によって、最初に95℃5分間、次いで94℃30秒、50℃30秒、70℃50秒を30サイクル行い、最後に70℃にて50秒間とした。

## 【0085】

VIPtランダム断片を挿入するために、AflIIリンカーを構築した。AflII制限酵素認識部位（AflIIリンカー）を持つオリゴDNA断片をプラスミドベクターに導入した場合には、VIPh及びVIPt断片を順番に挿入することが可能となる。リンカーの2つの相補的なオリゴヌクレオチド配列は、5'-CTA GAA GTC CTT AAG AGT CGG GCC-3'（配列番号10：AflIIリンカー1）及び5'-CGA CTC TTA AGG ACT T-3'（配列番号11：AflIIリンカー2）とした。AflIIリンカーには、5'及び3'末端のそれぞれに、XbaI及びApaI（GGGCCC）部位に適した粘着末端が形成された。

## 【0086】

最初に、20  $\mu$ lのAflIIリンカー1、20  $\mu$ lのAflIIリンカー2及び0.5  $\mu$ lの1M Tris/HCl pH7.5の混合物を100℃で煮沸し、その後、互いにアニーリングするよう、その温度が室温に達するまで冷却した。次に、pRc/CMV2-flag-VIPhベクターを適切な酵素によってXbaI及びApaI制限酵素認識部位で消化し、その後、1%アガロースゲル電気泳動によってベクターを回収し、次いでQIAquickゲル抽出を行った。その後、リンカーとpRc/CMV2-flag-VIPh（VIPhの3

末端のXbaI部位、及びpRc/CMV2のApaI部位で消化した)を以下のような組成でライゲーションした。すなわち、3 $\mu$ lの32nM pRc/CMV2-flag-VIPh、3 $\mu$ lの約172 $\mu$ M AflIIリンカー、6 $\mu$ lのTakara ligation kitのSolution I (Takara)であった。ライゲーション混合物を15℃で6時間又は一晩保温した。

## 【0087】

その後、ライゲーション混合物を大腸菌細胞(JM109)に形質転換した。具体的には、4 $\mu$ lの反応混合物を50 $\mu$ lのCaCl<sub>2</sub>処理した大腸菌に加え、事前に15mlチューブ中で冷却した。それを30分間氷上に置き、次いで4℃で1分間、振とうせずに保温した。直ちに氷上で2分間冷却した。形質転換した細胞を37℃で1時間SOC培地(10mlの2Mグルコースを添加したSOB培地:500ml当たり、バクトトリプトン10g、バクト酵母抽出物2.5g、NaCl 0.29g、KCl 0.09g、1M MgCl<sub>2</sub>+1M MgSO<sub>4</sub>の混合物10mlを含む)で培養した後、細胞をLB-Ampプレートに塗布し、コロニーを成長させるために37℃で一晩培養した。

## 【0088】

4つのコロニーを選抜してLB-Amp培地で一晩培養し、次いでプラスミド抽出を行った。これらの4つのコロニーのうち、少なくとも1つのコロニーについて、AflIIによる消化とそれに次ぐ電気泳動によって、プラスミドを包含することを確認した。プラスミド(pRc/CMV2-flag-VIPh-AflII)を配列決定し、100 $\mu$ lのTEバッファー(350ng/ $\mu$ l)中に保存した。

## 【0089】

(2) VIPtのpRc/CMV2-flag-VIPh-AflIIへの挿入  
VIPran3及びVIPran5プライマーはVIP36遺伝子の3'末端側半分(VIPt断片、全長1407のうち481-1071ヌクレオチド、突然変異導入)を構築するためのPCRに用いた(図2)。VIPt断片は、ランダムに変異したヌクレオチドを含むようにするため、PCRを行うために比較的

厳密でない校正活性を持つKOD dash DNAポリメラーゼ (TOYOBO) を選択した。ランダムライブラリー構築のため大量で広い多様性を持つ変異VIPt断片が得られるよう、反応条件を最適化するために様々なPCR条件を試した。その結果、ランダム化プライマー (VIPran3プライマー) の最適濃度は30 pmol/ $\mu$ lと決定した。これに対し、VIPran5プライマーは、10 pmol/ $\mu$ lと決定した。特に、25 mM MgSO<sub>4</sub>を含むPCRを選択した。

#### 【0090】

KOD plus (TOYOBO) DNAポリメラーゼをもまたPCR増幅のために使用し、最適化のための実験を行った。

VIPt断片をAflII (断片の3'末端) 及びXbaI (5'末端) で消化した。小さい消化断片を除去するため電気泳動し、その後VIPt断片を、pRc/CMV2-VIPh-AflIIのVIPhの3'末端のXbaI部位及びAflIIリンカーのAflII部位が消化されたpRc/CMV2-flag-VIPh-AflIIにライゲーションした。ライゲーション溶液を15℃で一晩保温した。制限酵素認識部位AflIIは2つの理由から制限酵素BfrIによって消化されることが重要であった。第一の理由は、それがAflII酵素と同じ配列を認識すること、第二の理由は、AflII酵素によって消化された部位は低いライゲーション反応効率を生じることが製造メーカーによって報告されており、それはライブラリーの構築にとって重大であったからである。

大腸菌JM109への形質転換は、上述と同様に標準的な手法により行った。

#### 【0091】

ElectroMax<sup>TM</sup> DH5alpha-E<sup>TM</sup>細胞 (Gibco BRL, Life Technologies: カタログ番号11319-019) を用いたエレクトロポレーションも行った。エレクトロポレーションを行う前に、ライゲーション溶液を精製し、標準的な方法でエタノール沈殿によって濃縮した。また、15 ml 試験管で1 mlのSOC培地を37℃で前もって保温し、キュベットを氷上で冷却し、別の新しい15 ml 中1  $\mu$ lのpRc/CMV2-flag-VIPh-VIPt DNAを氷上で冷却した。20  $\mu$ lのDH5alpha-E<sup>TM</sup>細胞をpRc/CMV2-flag-VIPh-

VIPt DNAを含む上記の試験管に添加した。2回穏やかにピペットで懸濁した後、プラスミド-大腸菌混合物を先に冷却しておいたキュベットに移した。その後、Electro Cell Manipulator(登録商標) 600 (BTX) によって2.45 kV及び129  $\Omega$ の条件下でエレクトロポレーションを行った。上記の条件は、いくつかの電圧条件の簡単な試験の後に選択された。1.5、2.0及び2.45 kVの電圧を試験した。直ちに(1分以内に)、1 mlの予め保温したSOC培地を添加し、穏やかに混合した。溶液を新しい15 ml試験管に移し、37℃で1時間培養した。その後、1時間培養した溶液各100  $\mu$ lをLB-Amp寒天プレートに塗布した。プレートを37℃で一晩培養した。形成されるコロニー数が $1 \times 10^6$ に達するまでエレクトロポレーションを繰り返した。いくつかのコロニーを配列決定のために選抜し、pRc/CMV2-flag-VIPh-VIPtのランダムな突然変異が導入されたかどうかを確認した(図3)。塩化カルシウム法とエレクトロポレーションの両方によって形質転換された、ベクターへの挿入断片の数は、XbaI及びBfrIによる制限消化によって決定した。

### 【0092】

#### (3) VIP36ランダムライブラリーの回収

まず最初に、50 mlのLB-Amp培地をコロニーを培養しているLB-Amp寒天プレートに加えた。コンラージ棒(TGK)を用いてコロニーを添加した培地と穏やかに混合することによって、コロニーを寒天から物理的に分離した。その後、懸濁液を新しい50 mlチューブに移した。懸濁液はその後、細胞増殖のため更に培地を与えるために、LB-Amp培地で50 mlにそろえた。培地中の懸濁液は37℃で一晩培養した。培養の間は空調に注意した。一晩培養した大腸菌懸濁液500  $\mu$ lを保存用として回収し、-80℃で17%グリセロール中に保存した。上記の方法を各々の寒天プレートについて行った。懸濁液からプラスミドを抽出するために、10枚の異なる寒天プレート由来の懸濁液を一緒に適切な量混合した。各プレートから混合する懸濁液の量は、各プレートのコロニー数の比率によって決定した。これは特定の突然変異を持つVIP36 DNAが他のものより優勢になることを避けるためである。混合物からQIAGEN



Plasmid Midi Kitによってプラスミドを回収し、 $100\mu\text{l}$ のバッファー中で保存した。その後、プラスミド（ランダム化されたVIPtの糖鎖認識部位を有すると推定されるpRc/CMV2-flag-VIPh-VIPtの混合物）を32本の $15\text{ml}$ チューブにプールし、以後の実験に使用した。

### 【0093】

プラスミドに導入されたインサートを調べるために、数個のコロニーを拾い上げ、大腸菌細胞から抽出されたプラスミドをXbaI及びBfrIで消化した。培養された総コロニー数の少ないプレート（通常40～200コロニー）では、調べた12のうち10コロニー（83%）が目的のプラスミドを含んだのに対して、総コロニー数の多いプレート（1000～6000コロニー）では、6のうち4コロニー（67%）が目的のプラスミドを持っていた。従って、概算されたライブラリーのサイズは、 $8 \times 10^5$ 、又は $6 \times 10^5$ であった。ランダムに突然変異させた糖鎖認識部位をコードする遺伝子は、配列解析によって確認した（図3）。

### 【0094】

#### 〔実施例2〕細胞へのトランスフェクション

##### (1) Effectene<sup>TM</sup>による安定なトランスフェクション

実施例1において構築されたVIP36ライブラリーは、32本の $15\text{ml}$ チューブに保存されているため、まず、32本の個別のプールに別々に保存されているライブラリー溶液の一部を混合することによって、TEバッファー $117.4\mu\text{l}$ 中にプラスミドを調製した。混合する溶液の割合は、各ライブラリープールに含まれる個々のクローンの規模に従って決定した。この計算は、ランダム化された糖鎖認識部位（CRD）の多様性を等しく保つようにした。具体的には、500クローン規模のライブラリーから $0.25\mu\text{l}$ （ $0.5\mu\text{l} \times 5$ チューブ）、6000クローン規模のライブラリーから $5.4\mu\text{l}$ （ $0.6\mu\text{l} \times 9$ ）、1000クローン規模のライブラリーから $0.1\mu\text{l}$ （ $0.1\mu\text{l} \times 1$ ）、 $1 \times 10^4$ クローン規模のライブラリーから $10\mu\text{l}$ （ $1\mu\text{l} \times 1$ ）、 $6 \times 10^4$ クローン規模のライブラリーから $66.0\mu\text{l}$ （ $6\mu\text{l} \times 11$ ）、 $1.5 \times 10^4$ ク

ローン規模のライブラリーから  $1.5 \mu\text{l}$  ( $1.5 \mu\text{l} \times 1$ ) が、 $8 \times 10^4$  クローン規模のライブラリーから  $320 \mu\text{l}$  ( $8 \mu\text{l} \times 4$ ) を分取した。

## 【0095】

上述のように調製したプラスミド (VIP36mix と称する) を BglII による消化によって直鎖状にし、 $37^\circ\text{C}$  で一晚保温した。その後、直鎖状にした VIP36mix を 1% アガロースゲル電気泳動し、ゲルから抽出した。消化後の DNA 濃度は  $475 \text{ ng}/\mu\text{l}$  であった。

トランスフェクション当日に 80~90% コンフルエントとなるよう、トランスフェクションの 1 日前に、MDCK 細胞を継代培養した。

## 【0096】

製造メーカーによって提供された手順に従って、VIP36mix プラスミドを MDCK 細胞 (ATCC 寄託番号 CCL-34) にトランスフェクトした。 $4 \mu\text{g}$  (すなわち、 $8.42 \mu\text{l}$ ) の VIP36mix を  $15 \text{ ml}$  チューブに加えた。その後、 $300 \mu\text{l}$  の EC バッファーを加え、ボルテックスミキサーを用いて 1 秒間だけ穏やかに混和した。その混合物を室温に 4 分間静置した。上記の混合物に  $48 \mu\text{l}$  の Effectene 試薬 (QIAGEN) を加え、10 秒間穏やかにボルテックスにかけた。その混合物を再度室温で 9 分間静置した。DNA 調製の際に、D10 培地 (10% FCS、10 mM HEPES 及びペニシリン ( $100 \text{ U}/\text{ml}$ ) - ストレプトマイシン ( $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (Sigma)) をデカンテーションし、プラスチックディッシュ ( $\phi 100 \text{ mm}$ ) 中で培養した MDCK 細胞を  $5 \text{ ml}$  の PBS で洗浄した。その細胞を  $7 \text{ ml}$  の新しい D10 培地に懸濁した。他方のチューブ内で、 $3 \text{ ml}$  の D10 培地を上述のように調製した DNA-試薬混合物に加え、2 回のピペティングによって穏やかに混和した。その混合物を、直ちに、上記で準備した MDCK 細胞に一滴ずつ滴下した。その細胞を 5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で 2 日間  $37^\circ\text{C}$  で培養した後、D10 培地を新しく取りかえ、うまくトランスフェクトされた細胞を選択するために、G418 を添加した (最終濃度  $2.0 \text{ mg}/\text{ml}$ )。ネオマイシン耐性細胞が増殖するまで、細胞を 14 日間静置した。pRc/CMV2 ベクターは、うまくトランスフェクトされた時に発現するネオマイ

シン耐性遺伝子を持っていた。トランスフェクションから14日後、2.0mg/mlのG418の存在下で、約100のコロニーが形成された。

## 【0097】

(2) LipofectAMINE<sup>TM</sup>2000による安定なトランスフェクション

等量のVIP36mixを上述のようにして調製した。トランスフェクションを行う際に95%コンフルエント以上になるよう、トランスフェクションの2日前に細胞を準備した。細胞は10mlのD10培地中で培養した。

トランスフェクション当日、24 $\mu$ gのVIP36mix DNA（すなわち、55 $\mu$ lの439 $\mu$ g/ $\mu$ l DNA）を15mlのOptiMEM（登録商標）I還元血清培地（Gibco BRL）に希釈した。同時に、別の15mlのOptiMEM（登録商標）I還元血清培地に75 $\mu$ lのLipofectAMINE<sup>TM</sup>2000試薬（Invitrogen）を添加し、室温に5分間静置した。その後、別々の培地中のVIP36mix DNAとLipofectAMINE<sup>TM</sup>2000試薬との両方を混合し、室温に30分間静置した。VIP36mix DNAとLipofectAMINE<sup>TM</sup>2000試薬が複合体を形成している間に、MDCK細胞を5mlのPBSで2回洗浄し、13mlのOptiMEM（登録商標）I還元血清培地を加えた。用意ができたなら、3mlのVIP36mix DNAとLipofectAMINE<sup>TM</sup>2000試薬の混合物を、直接、MDCK細胞に一滴ずつ添加した。プレートを前後に振とうした。細胞を5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で24時間37℃で培養した。

## 【0098】

24時間の培養後、OptiMEM（登録商標）I還元血清培地を除去し、2つの $\phi$ 150mmディッシュに、D10培地22.5mlで、標準的な継代培養法を用いて継代培養した。24時間後、2つの15cmディッシュにG418を添加した（最終濃度2.0mg/ml）。G418耐性細胞を増殖させるため、細胞を5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で10日間37℃で培養した。トランスフェクションから10日後、2.0mg/mlのG418の存在下で、細胞は約80%コンフルエントであった。

【0099】

## (3) 蛍光顕微鏡による変異VIP36の観察

MDCK細胞のトランスフェクション率を推定するために、蛍光顕微鏡のためのサンプルを作製した。マイクロカバーガラス(18×18mm、MATSUMI)を100%エタノール及びガスバーナーによって滅菌し、細胞を培養する前に、6ウェルプレートの各ウェルの底に置いた。サンプルあたり $4 \times 10^4$ 細胞を6ウェルプレート中で24時間培養した後、細胞をPBSで1回洗浄した。その後、細胞を固定するために、PBS中4.0%のホルムアルデヒドを1ml添加し、室温に1時間静置した。固定された細胞をPBSで1回洗浄し、抗体が細胞膜から浸透して細胞内の抗原に結合できるよう、それらをPBS中0.3%のTriton X-100(Sigma) 1mlで処理した。その後、細胞を20分間室温で静置し、続いて、PBSによる5分間の洗浄を3回行った。次に、PBS中5%のBSA 1mlを添加することによってブロッキングを行い、室温に15分間静置した。細胞をPBSで5分間3回洗浄した。カバーガラス周囲のPBSを拭き取った後、3mg/ml抗flag M2抗体(ABI)から調製した5% BSA/PBS中の抗flag抗体( $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ )  $200 \mu\text{l}$ を、観察のために細胞を培養したカバーガラスに重層した。抗flag抗体を変異VIP36のflagタグに結合させるため、細胞を1時間室温に置いた。10分間3回洗浄し、上述のようにブロッキングを行った。次に、PBSで5分間3回洗浄し、 $200 \mu\text{l}$ の5% BSA/PBS中フルオレセインイソチオシアネート(FITC)標識化抗マウスIgG<sub>1</sub>(GAM-FITC、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ )をカバーガラスに重層し、GAM-FITCを抗flag抗体に結合させるため、1時間室温で静置した。その後、細胞をPBSで10分間3回洗浄した。最後に、マイクロスライドガラス(MATSUMI)に、 $3 \mu\text{l}$ の100mM DAPI(4', 6-ジアミジノー-2-フェニルインドールジヒドロクロライド, Molecular Probes)及び $3 \mu\text{l}$ のSlowfade(登録商標) Light Antifade Kit (Molecular Probes)の成分A(グリセロールバッファー中の退色防止剤)を添加し、作製したカバーガラスを、細胞培養面をスライドガラスに伏せて、スライドガラス上に置いた。サンプルはマニキュア(Kaneko)によって密閉し、

蛍光顕微鏡 (Olympus BX52、図4) で観察した。

#### 【0100】

顕微鏡で捉えられた細胞のうち、792細胞中50細胞 (6.3%) が変異VIP36を過剰発現したことが示された。従って、推定トランスフェクト細胞数は  $2.0 \times 10^6$  細胞あたり  $1.26 \times 10^5$  細胞であった。 $2.0 \times 10^6$  という数は、 $\phi 100$  mmディッシュ上のコンフルエント細胞を2~3回数えることによって得られた。位相差像 (図4A又はD)、蛍光像 (図4B又はE) 及び両者を重ねた像 (図4C又はF) の中の代表的な写真を、トランスフェクト細胞及び野生型MDCK細胞それぞれに対して示す。

#### 【0101】

##### 〔実施例3〕糖質に基づくトランスフェクト細胞の分離

##### (1) 植物レクチン

細胞表面に現れるオリゴ糖の独特の構造に基づいてトランスフェクトMDCK細胞を分離するために、いくつかの植物レクチンを用いた。様々なタイプのオリゴ糖を区別するために、10の植物レクチンを用いた。用いられたレクチンの糖質特異性は、上記表1に示すように正確に解析されている。

#### 【0102】

レクチンに結合した細胞をストレプトアビジンマイクロビーズ (Milenyi Biotech、ストレプトアビジンと結合したコロイド状常磁性マイクロビーズ) によって認識できるように、ビオチン化レクチン (Honen Co.) を選択した。用いたレクチンは、ABAレクチン、ConAレクチン、DSAレクチン、LCAレクチン、Lotusレクチン、MAMレクチン、ホモ四量体E-サブユニットを持つPHA-E<sub>4</sub>レクチン、ホモ四量体L-サブユニットを持つPHA-L<sub>4</sub>レクチン、RCA120レクチン、及びWGAレクチンとした。数ある中からこれらのレクチンを選択したのは、これらのほとんどがN-結合型及びO-結合型オリゴ糖を認識することが知られているからであった。N-結合型オリゴ糖は本来のVIP36レクチンによって認識されと考えられた。磁気細胞分離法のために、1mg/mlのレクチンをPBSで希釈し (最終濃度5μg/ml)、25mM Acrodisc (登録商標) シリンジフィルター0

、 $2\mu\text{m}$  (Pall Co.) を用いて濾過滅菌した。

#### 【0103】

##### (2) 変異VIP36トランスフェクトMDCK細胞の磁気細胞分離法

細胞表面に提示される糖質に基づいて細胞を回収するために、磁気細胞分離法、磁気で標識した細胞を標識されていない細胞と分離するシステムを選択した。MiniMACS、細胞及び高分子の分離のためのMACS分離装置は、Miltenyi Biotecから購入した。MiniMACSは、 $10^7$ 個の磁気標識細胞までの分離に適しており、MiniMACS分離ユニット、MACSマルチスタンド、及びMSカラムを一式を包含する。ビオチン化レクチン結合細胞の間接的な標識のために、ストレプトアビジンマイクロビーズ (ストレプトアビジンと結合したコロイド状常磁性マイクロビーズ) を用いた。

#### 【0104】

この実験に用いたバッファーは、製造メーカーによって記載されている、標識バッファー (2 mM EDTAを含む $1\times$ PBS) 及び分離バッファー (2 mM EDTA及び0.5% BSAを含む $1\times$ PBS) とした。両バッファーは、25 mM Acrodisc (登録商標) シリンジフィルター $0.2\mu\text{m}$ を用いて濾過滅菌した。 $\phi 100\text{mm}$ ディッシュで培養した細胞を懸濁するために、PBS-EDTA又はトリプシン-EDTAを用いた。

#### 【0105】

分離の当日に約80~90%コンフルエントになるよう、分離の1日前に、変異VIP36トランスフェクトMDCK細胞を増殖させた。細胞をPBSで2回洗浄し、トリプシン-EDTA又はPBS-EDTAのいずれかで20分間処理した。回収した後、細胞数を数えるため、細胞を2 mlのD10培地に懸濁した。19 G ( $1000\text{rpm}$ ) で5分間遠心した後 (以下のすべての遠心分離において同一の遠心条件を適用した)、細胞を10 mlのPBSで1回洗浄した。再度遠心し、その後、細胞を15 mlのレクチン溶液 ( $5\mu\text{l/ml}$ ) に希釈した。氷上に30分間置いた後、レクチン結合細胞を遠心分離によって回収した。上清は、注意深く完全に吸引した。2次抗体の結合を最大限にするため、細胞の洗浄のために、 $300\mu\text{l}$  (又は1 ml) のラベリングバッファーを加えた。細胞

は2回洗浄した。ビオチン化レクチンを結合させるために、 $10\mu\text{l}$ のストレプトアビジンマイクロビーズを加えた。溶液をよく混合し $8^{\circ}\text{C}$ で15分間静置した。その後、マイクロビーズ結合細胞を遠心分離によって回収して、 $500\mu\text{l}$ の分離バッファーに再懸濁し、以下の分離のために氷上に静置した。

分離過程を始める前に、MACSマルチスタンドに付いているMiniMACS分離ユニットにMSカラムを用意し、両方を70%エタノールで滅菌した。

【0106】

細胞を分離するために、初めに $500\mu\text{l}$ の分離バッファーを添加したMSカラムを用意した。その後、 $500\mu\text{l}$ の分離バッファー中のマイクロビーズ結合細胞をカラムに添加した。添加した溶液は自然流出によって通過させた。陰性細胞を含む通過画分を $15\text{ml}$ チューブに採取した。カラムを $500\mu\text{l}$ の分離バッファーで3回洗浄した。洗浄過程においてカラムを通過した分離バッファーもまた、同じ $15\text{ml}$ チューブに回収した。その後、陽性細胞の回収のため、MSカラムをMACSマルチスタンドから移動させた。 $1\text{ml}$ の分離バッファーの添加によって、カラム中の陽性細胞を新しい $15\text{ml}$ チューブに採取し、続いて直ちに、製造メーカーによって提供されたプランジャーを用いて陽性細胞を完全に洗い出した。陽性及び陰性の採取細胞は、血球計算板(Erma)によって数え、表2A及びBに示す。表中、トランスフェクトMDCK(A)及び(B)の欄に記載の数値は、それぞれ独立して(2回)トランスフェクションを行った結果である。

【0107】

【表 2】

A: 植物レクチンにより分離されたトランスフェクト細胞数 ( $\times 10^5$ )

細胞型	トランスフェクトMDCK(A)		トランスフェクトMDCK(B)		野生型MDCK	
MACS分画	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
ConA	16	1.6	2.1	5.7	4.4	0.4
LCA	11	12	3.2	3.5	3.3	1.4
PHAE4	0.8	22	3.5	0.55	3.3	1.6
RCA120	no cell	no cell	n/a	n/a	n/a	n/a
WGA	13	24	5.2	6.2	2.3	1.65
ABA	9.2	18	5.8	12	4.3	0.85
PHAL4	16	9.2	1.6	2.1	1.85	2.95
MAM	17	20	0.38	22	0.85	4.55
Lotus	n/a	n/a	0.68	23	0.2	4.95
DSA	n/a	n/a	5	21	4.05	0.6

## B: 植物レクチンにより分離された陽性細胞及び陰性細胞の比率

細胞型	トランスフェクトMDCK(A)		トランスフェクトMDCK(B)		野生型MDCK	
MACS分画	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
ConA	90.9	9.1	26.9	73.1	91.7	8.3
LCA	47.8	52.2	47.8	52.2	70.2	29.8
PHAE4	3.5	96.5	86.4	13.7	67.3	32.7
RCA120	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
WGA	35.1	64.9	45.6	54.4	58.2	41.8
ABA	33.8	66.2	32.6	67.4	83.5	16.5
PHAL4	63.5	36.5	43.2	56.8	38.5	61.5
MAM	45.9	54.1	1.7	98.3	15.7	84.3
Lotus	n/a	n/a	2.9	97.1	3.9	96.1
DSA	n/a	n/a	19.2	80.8	87.1	12.9

## 【0108】

上述のすべての手順を、検査される10種類のレクチン、すなわち、ConA、LCA、PHA-E4、WGA、ABA、PHA-L4、MAM、RCA120、Lotus及びDSAレクチンの各々に適用した。初めの7種類のレクチン



に対しては、実験は独立に 2 回行った。

【0 1 0 9】

分離された細胞は、レクチン陽性又はレクチン陰性分画として回収した。陽性と陰性の両分画で回収された細胞の数を血球計算板（表 2 A）で数え、分離の比率は表 2 B に示した。計算された比率は、1 回目の実験における PHA-E<sub>4</sub> の分離比は 2 回目で逆になることを示した（表 2 B の 3 列目）。MAM による陽性分画の比率は、2 回目の実験では回収された全細胞の 45.5% から 1.7% にまで減少した（8 列目）。野生型 MDCK の分離比と比較すると、Lotus による陽性分画は、トランスフェクト細胞及び野生型 MDCK 細胞表面の分離において、回収された全細胞の 2.9% 及び 3.9% という結果であった（下から 2 列目）。これは、フコース残基が細胞上にほとんど現れていないことを示唆する可能性がある。DSA レクチンによる分離は、陽性に回収されたトランスフェクト細胞が野生型のものより少ないことを示している（最下列）。

1 回目の実験が行われた時（表 2 の（A）の結果）、PHA-E<sub>4</sub> レクチンは全回収分の 3.5% を共有した陽性分画として選ばれた。陽性分画の糖質の特異性はまた、フローサイトメトリー解析（実施例 4 参照）によっても観察された。

【0 1 1 0】

（3）PHA-E<sub>4</sub> 及び WGA 陽性トランスフェクト細胞の多重磁気細胞分離法

上記（2）の分離法よりも更に大規模に各細胞グループを分離するために、2 つのグループの変異 VIP 36 トランスフェクト MDCK 細胞を 2 回目、3 回目の磁気細胞分離法に進めた。選択したトランスフェクト細胞の 1 つのグループは PHA-E<sub>4</sub> レクチン陽性細胞であり、他方は WGA 陰性細胞であった。これらの 2 つの細胞グループを、上述の手順で 3 回、MiniMACS による分離にかけ、前者は陽性細胞の後者は陰性細胞のそれぞれ濃縮を行った。同様に、3 回の磁気細胞分離を行った。細胞グループの両方を血球計算板によって数えた（表 3）。

【0 1 1 1】

【表 3】

PHA-E <sub>4</sub> 及びWGAにより分離された細胞数(×10 <sup>5</sup> )						
MiniMACS番号	MiniMACS, 第1回目		MiniMACS, 第2回目		MiniMACS, 第3回目	
MACS分画	陽性	陰性	陽性×2	陰性×2	陽性×3	陰性×3
PHAE4	0.8	2.2	4.5	4	3.8	10.6
WGA	5.2	6.2	4.8	4.2	6.7	1.1

【0112】

## (4) 野生型MDCK細胞の磁気細胞分離法

野生型のMDCK細胞を上述の手順によってMiniMACSで調べた。細胞は上述のように数え、表2に示した。使用したビオチン化レクチンは、ConA、LCA、PHA-E<sub>4</sub>、WGA、ABA、PHA-L<sub>4</sub>、MAM、Lotus及びDSAレクチンであった。

【0113】

## 【実施例4】フローサイトメトリーによる細胞表面の糖鎖解析

## (1) トランスフェクト及び野生型MDCK細胞の両分離細胞のフローサイトメトリー

本実施例では、変異VIP36遺伝子の過剰発現に伴う細胞の糖鎖構造を研究するため、フローサイトメトリー解析を行った。ビオチン化レクチンとそれに次ぐストレプトアビジン-FITCで染色した細胞の蛍光強度を測定し、ヒストグラムに記録した。MiniMACSによって、1回目、2回目又は3回目に陽性に分離されたトランスフェクト細胞、及び1回目、2回目又は3回目に陰性に分離されたトランスフェクト細胞を解析した。MiniMACSによって陽性又は陰性に分離された2つのグループの野生型MDCK細胞もまた、これらのトランスフェクト細胞と比較するために解析した。MiniMACS分離によって調製した、合計53個の独立したMDCK細胞グループを用いた。各レクチン(9種類のレクチン)に対して、トランスフェクト細胞と野生型MDCK細胞との両方(2つの細胞型)の、レクチン陽性及び陰性グループ(2つのグループ)の小計が36グループとなった。多重磁気分離法によって得られた濃縮細胞グループの小計は8グループであった。9種類のレクチンに対する対照MDCK細胞の小計

が9グループとなった。

【0114】

解析時に細胞がコンフルエントに達しないよう、フローサイトメトリー解析の前日、各グループのMDCK細胞を6cmディッシュ中の4mlのD10培地で培養した。

【0115】

解析の当日、各ディッシュの細胞をPBSで2回洗浄し、次いで、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃30分間、500μlのPBS-EDTA（又はトリプシン-EDTA）で処理した。懸濁し、250μlの細胞を96ウェルプレートに移し、51G（1800rpm）で1分間遠心した（以下のすべての遠心分離において同一の遠心条件を適用した）。その後、細胞を200μlのFACSバッファー（0.1%BSA及び0.1%アジ化ナトリウムを含むHBSS（Gibco BRL））で洗浄した。1次染色のため、50μlの各レクチン（10μg/ml）を各々の適切なウェルに添加し、氷上に30分間静置した。レクチン結合反応後、100又は200μlのFACSバッファーで洗浄し、遠心及びデカンテーションを3回行った。雑菌混入を避けるため、FACSバッファーのデカンテーションは慎重に素早く96ウェルプレートを転倒することによって行った。2次抗体の結合は、50μlのストレプトアビジン-FITC（20μg/ml）の添加と氷上での正確に30分間の静置によって行った。150又は200μlのFACSバッファーによる洗浄の後、各細胞ペレットを200μlのFACSバッファーに懸濁し、1.2mlチューブ（Marsh Biomedical Products）に移した。3μg/mlのヨードプロピジウム（PI, Sigma）100μlの添加後、細胞をFACScalibur（登録商標）（Becton Dickson）によって解析した。コンピューターによるデータ解析はCell Quest（登録商標）（Becton Dickson）プログラムを用いて行った。結果を図5及び6に示す。

【0116】

変異VIP36トランスフェクト細胞の場合には、大部分の分離細胞は、1回目の実験に対する分離比に有意差を示さなかった。この結果は、同じレクチンを

用いたフローサイトメトリー解析によって裏付けられた（図5）。しかし、TFPHA-E4+及びTFPHA-E4-細胞は明らかに固有の分離比で分離した。測定した相対的蛍光強度の平均値は、TFPHA-E4+で1786.00、TFPHA-E4-で649.30であった。一方、野生型ではそれぞれ、1034.20及び1127.68であった。非分離野生型MDCK細胞の平均値は852.76であった。

#### 【0117】

TFPHA-E4+及びTFPHA-E4-細胞の両方は更にMiniMACS分離によって濃縮し、フローサイトメトリーによって解析した。結果は、TFPHA-E4++（2回のMiniMACS分離後回収された陽性細胞、同一の省略形を以下に適用する）及びTFPHA-E4--の平均値が、それぞれ1135及び660であることが示された（図6）。

#### 【0118】

#### （2）PBS-EDTA又はトリプシン-EDTA処理の影響

細胞を1次染色のために懸濁する際、細胞表面の糖鎖形成へのトリプシンの影響を調べるために、2つの独立の野生型MDCK細胞グループをそれぞれPBS-EDTA又はトリプシン-EDTAで処理した。フローサイトメトリーの手順は上記（1）と同様に行った。結果を図7に示す。

#### 【0119】

用いられた9つのレクチンのうち8つのレクチンは結合親和性において有意差を示さなかったが、一方、Lotusレクチンで染色された細胞はトリプシン処理された細胞により高い結合親和性を示した（図7）。加えて、トリプシン処理した細胞はPIでほとんど染色されず、大部分の細胞が実験中に死ななかったことを示唆している（図7A）。

#### 【0120】

上記実施例1～4においては、分泌経路において糖タンパク質輸送を担うVIP36にランダム突然変異を導入することによって、細胞表面の糖鎖形成を改変する実験を行った。

#### 【0121】

フローサイトメトリー解析でのレクチンの使用によって、MDCK細胞は高度

に多様なオリゴ糖を持つことが示された。PHA-E<sub>4</sub>レクチンによって分離されたトランスフェクトMDCK細胞は明らかにレクチン結合活性に有意差を示し、レクチンによる選択を繰り返すことにより特定の糖鎖に対する特異性が増強した細胞のクローンを濃縮することが示された。

#### 【0122】

〔実施例5〕 ERGIC-53のためのランダム変異導入用PCRプライマーの設計

ERGIC-53の糖鎖認識部位にランダムな改変を導入するにあたって、実施例1に記載のVIP36の場合と同様に二段階に分けて行うPCR法を用いることとした。図8が、設計したプライマーとERGIC-53との相関図である。③は糖鎖認識部位をランダム化するランダムプライマーとして設計した。①と②のプライマーを用い、ERGIC-53を鋳型としてPCRを行い、出来上がったDNAフラグメント（ERGIC-53の糖鎖認識部位を含まない前半部分、以下ERGIC-Fと呼ぶ）をpRC-CMV2-CD8-FLAG（pRC-CMV2にCD8のシグナル配列とFLAGタグを付けたベクター）に組み込む。その後、③のランダムプライマーと④のプライマーを用い、ERGIC-53を鋳型としてPCRを行うことにより出来上がったDNAフラグメント（ERGIC-53の糖鎖認識部位を含む後半部分、以下ERGIC-B-r a n d o mと呼ぶ）をERGIC-Fの入ったpRC-CMV2-CD8-FLAGに導入する、という手法でERGIC-53ランダムライブラリーを作製した。この手法においてランダム化した部位はPCRで増幅されることはないため、片寄りなく多種の変異を導入することが可能である。

#### 【0123】

作製したプライマーの名称及び塩基配列は、以下の通りである：

① ERGIC-FF（下線部分はHincIIサイト）

5'-GTACGTTCGACGGCGTGGGAGGAG-3'（配列番号12）

② ERGIC-FR（下線部分はXbaIサイト）

5'-CGTATCTAGAAATATCCAACACCATTCCA-3'（配列番号13）

③ ERGIC-BF（下線部分はXbaIサイト、KはG若しくはT、XはA、

T、G、Cのいずれかに相当する)

5'-CGTATCTAGATXXXXXXXXXXKAATXXXXXXXXXXKAATAATCCTGCTATAGTAATTAT-3' (配列番号14)

④ ERGIC-BR (下線部分はBfrIサイト)

5'-CGTACTTAAGTGGTAGTCAAAAGAATTTTTTG-3' (配列番号15)

【0124】

【実施例6】 ERGIC-53ランダムライブラリーの作製

(1) プラスミドpRC/ERGIC-Fの作製

pBluescriptに組み込まれたERGIC-53を鋳型としてPCR法を行い、ERGIC-53の糖鎖認識部位を含まない前半部分、ERGIC-Fの遺伝子の増幅を行った。プライマーは、上記実施例5で設計したものを用い、フォワードプライマーにはERGIC-FF、リバープライマーにはERGIC-FRを用いた。PCR反応液は、フォワードプライマーERGIC-FF 2  $\mu$ l、リバープライマーERGIC-FR 2  $\mu$ l、テンプレートERGIC-53 (1 ng/ $\mu$ l) 2  $\mu$ l、25 mM MgSO<sub>4</sub> (TOYOBO) 3.2  $\mu$ l、2 mM dNTPs (TOYOBO) 4  $\mu$ l、10×PCR Buffer for KDD-PLUS (TOYOBO) 4  $\mu$ l、KDD-PLUS DNAポリメラーゼ (TOYOBO) 0.8  $\mu$ l、Milli-Q水22  $\mu$ lを混合したものである。PCR反応は、94℃にて2分間、(94℃にて15秒、52℃にて30秒、及び68℃にて1分間)×30サイクル、68℃にて7分間の条件で行った。なお、両プライマーはあらかじめリン酸化しておいたものを用いた。PCR産物から、1%アガロースゲルを用いた電気泳動 (Mupid-21ミニゲル泳動槽：コスモバイオ株式会社) により目的のフラグメントERGIC-Fを分離し、GeneClean Spin Kit (BIO101) で精製したものをインサートフラグメントとした。

pBluescript II SK (+) をSma I (TOYOBO) で制限酵素処理し、これを脱リン酸化 (BAP処理) した後、フェノール/CHCl<sub>3</sub>抽出し、エタノール沈殿して得たものをベクターとして使用した。

【0125】

上記ベクター pBluescript II SK (+) Sma I カット済と、インサート DNA フラグメント ERGIC-F をモル比 1 : 10 の割合で混ぜ、ライゲーションを行った。ライゲーション後の反応液を、CaCl<sub>2</sub> 法によりコンピテントセル JM109 に形質転換 (トランスフォーメーション) し、LB-Amp プレートにまいた。

## 【0126】

プレートに生えてきた青と白のコロニーのうち、白色のコロニーのみを数個選んで LB 液体培地 3 ml (終濃度 100  $\mu$ g/ml アンピシリン入り) で終夜培養し、アルカリプレップ法によりプラスミドを抽出した。これに対してインサートチェックを行った結果、インサート DNA フラグメントがベクターに入っていることが分かったコロニーに対し、Plasmid Mini Kit (QIAGEN) を用いて再度プラスミド抽出を行い、DNA シークエンサー (LI-COR) にてインサート DNA フラグメントの配列を確認した。

## 【0127】

得られた DNA フラグメント 6 個中 3 個は正しい塩基配列であることが確認できた。そのうちの 1 つを、本実施例において得ることを目指したベクターとし、以降の実験に用いた。

## 【0128】

正しい配列のインサート DNA フラグメントがベクターに入っているプラスミドを選択し、HincII (TOYOBO) と XbaI (TOYOBO) で制限酵素処理した後、1% アガロースゲルに電気泳動し、Qiaquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) にて目的の DNA フラグメント ERGIC-F を精製した。

## 【0129】

RC-CMV2-CD8-FLAG (pRC-CMV2 に CD8 のシグナル配列と FLAG タグを付けたベクター) を HpaI (TOYOBO) と XbaI (TOYOBO) で制限酵素処理した後、1% アガロースゲルに電気泳動し、Qiaquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) で精製した。

## 【0130】

前述のベクターpRC-CMV2-CD8-FLAG (Hpa I、Xba Iカット済) と、上記DNAフラグメントERGIC-Fをモル比1:10の割合で混ぜ、ライゲーションを行った。ライゲーション後の反応液を、CaCl<sub>2</sub>法によりコンピテントセルJM109に形質転換(トランスフォーメーション)し、LB-Ampプレートにまいた。

## 【0131】

プレートに生えてきたコロニーのうち数個を選び、コロニーPCR法によりインサートチェックを行った。その結果インサートが入っていることが分かったものが、ベクターpRC-CMV2-CD8-FLAGにERGIC-Fが組み込まれた目的物であった。これを今後pRC/ERGIC-Fと呼ぶことにした。以降の実験に用いるために、pRC/ERGIC-FをPlasmid Mini Kit (QIAGEN) を用いて精製した。また、pRC/ERGIC-Fのグリセロールストックを作製し、-80℃の冷蔵庫で保管した。

## 【0132】

## (2) pRC/ERGIC-Randomの作製

上記(1)に記載の方法と同様に、ERGIC-53を鋳型としたPCR法を行って、ERGIC-53の糖鎖認識部位を含む後半部分、ERGIC-Bランダム遺伝子を増幅した。フォワードプライマーにはERGIC-BF、リバースプライマーにはERGIC-BRを用いた。PCR反応は、94℃にて2分間、(94℃にて15秒、54℃にて30秒、及び68℃にて1分間)×30サイクル、68℃にて7分間の条件で行った。

目的のフラグメントERGIC-Bランダムを分離した後、Qiaquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) で精製した。

## 【0133】

この後、Xba I (TOYOBO) とBfr I (TOYOBO) で制限酵素処理し、1%アガロースゲルを用いた電気泳動を行い、Qiaquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) で精製した。これをインサートDNAフラグメントとした。



## 【0134】

上記(1)において作製したベクターpRC/ERGIC-Fを、Xba I (TOYOBO)とBfr I (TOYOBO)で制限酵素処理し、0.8%アガロースゲルを用いた電気泳動により目的のフラグメントを分離し、Qiaquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)で精製した。以降、これをベクターとして用いた。

## 【0135】

前述のベクターpRC/ERGIC-F (Xba I、Bfr Iカット済)と、インサートDNAフラグメントERGIC-B-randomをモル比1:6の割合で混ぜ、ライゲーションを行った。ライゲーション後の反応液を、CaCl<sub>2</sub>法によりコンピテントセルJM109に形質転換(トランスフォーメーション)し、LB-Ampプレートにまいた。

## 【0136】

プレートに生えてきたコロニーから24個を無作為に選択し、3mlのLB液体培地(終濃度100 µg/µlになるようにアンピシリンを添加)中で終夜培養し、アルカリプレップ法によりプラスミド抽出を行った。その後、Apa I (TOYOBO)とHind III (TOYOBO)の2つの制限酵素でプラスミドを切断し、1%アガロースゲルで電気泳動することによりインサートチェックを行った。選択した24個中21個にインサートが入っていた。

## 【0137】

インサートチェックの結果、インサートDNAフラグメント(ERGIC-B-random)がきちんと入っていたものに対して、再度プラスミド抽出(Plasmid Mini Kit (QIAGEN)使用)を行った。pRC/ERGIC-Fに導入されたインサートDNAフラグメント(ERGIC-B-random)の部分に対し、PCRによるランダムイズが確実に行われているかを確認するためにDNAシーケンス解析を行った。今回解析したいDNA塩基配列はERGIC-53の糖鎖認識部位であり、9アミノ酸分と短いものであったので、ABIシーケンサーで解析した。配列解析の結果、全てのプラスミドの糖鎖認識部位の塩基配列が異なっていた。

## 【0138】

## (3) ERGIC-53 ランダムライブラリーの構築

上記(2)において pRC/ERGIC-Random、正確には糖鎖認識部位がランダム化された ERGIC-53 が、ベクター pRC-CMV2-CD8-FLAG に組み込まれたもの、を作製した。糖鎖認識部位の 9 アミノ (DTFDNDGKK) のうち 7 アミノ酸をランダム化 (DXXNXXXX, X は任意のアミノ酸を表す) したが、本発明においてはこの糖鎖認識部位に種々のアミノ酸を持つものを多数作る必要があった。そこで、pRC/ERGIC-Random ライブラリーを作製した。なお、以降このライブラリーを、ERGIC ランダムライブラリーと呼ぶこととした。

## 【0139】

## (3-1) ERGIC ランダムライブラリー作製にあたっての条件検討

上記(1)で作製したベクター pRC/ERGIC-F と上記(2)で作製したインサート DNA フラグメント ERGIC-B-random をライゲーションする時に、ベクター：インサートのモル比を 1：2、1：3、1：6、及び 1：10 と 4 段階に設定し、コンピテントセル JM109 に形質転換 (トランスフォーメーション) した。なお、ベクター (約 6 Kb) は 265 ng/μl、インサート (約 1 Kb) は 520 ng/μl の濃度のものを使用した。

## 【0140】

形質転換時に、コンピテントセルに入れるライゲーション後の DNA の量を、コンピテントセル 50 μl に対し、2 μl、3 μl、5 μl とふってみた。

形質転換に用いるコンピテントセルを、JM109 と DH5α の 2 種類用いて、効率の比較を行った (両方とも CaCl<sub>2</sub> 法のコンピテントセルである)。なお、ライゲーション時のベクター：インサートのモル比は 1：6 で行った。

## 【0141】

実験の結果、コロニーが生えてきた個数は、ベクター：インサートが 1：10 のものが一番多かったため、ベクター：インサートが 1：10 を最適モル比とした。また、DNA の量を検討したところ、50 μl のコンピテントセルに対し、5 μl の場合が一番コロニー数が多かった。従って本実験では、コンピテントセ

ル50  $\mu$ lにつき5  $\mu$ lのライゲーション後のDNAを用いることとした。さらに、DH5 $\alpha$ を用いた場合の方がJM109を用いた場合と比較して5倍の数のコロニーが生えた。ゆえに、DH5 $\alpha$ を用いることとした。

#### 【0142】

##### (3-2) ERGICランダムライブラリーの回収

LB-Ampプレート上に生えてきたコロニーの個数を、1枚のプレートごとに数えた。

個数をカウントしたプレートに生えているコロニーの中から、無作為に24個のコロニーを確認用にピックアップした。この確認用コロニーは、3mlのLB液体培地(100  $\mu$ g/mlアンピシリン入り)で終夜培養し、プラスミド抽出を行い、インサートチェック(ApaI、HindIIIの制限酵素で処理し、1%アガロースゲルにて電気泳動)を行った。インサートが入っていると確認されたプラスミドのうち、無作為に6個を選び、DNAシーケンサーによるシーケンス確認(糖鎖認識部位のランダムイズがきちんと成されているかの確認)を行った。インサートチェックとDNAシーケンスの結果から、プレートに生えてきたコロニーのうちの有効コロニーの確率を計算した。

#### 【0143】

確認用コロニー以外のものは、すぐさま回収を行った。この回収したもののうち、上記方法で算出した有効数のものをERGICランダムライブラリーとした。回収の具体的な方法は後述する。

#### 【0144】

LB-Ampプレート1枚あたり15mlのLB液体培地(100  $\mu$ g/mlアンピシリン入り)を加え、コンラージ棒で物理的にコロニーを剥がし取り、37℃で終夜振とう培養した。その後、培養液の一部(400  $\mu$ l)はグリセロールストックとしてプレート1枚ごとに保存した。残りの培養液はPlasmid Mini Kit(QIAGEN)にてプラスミド抽出した。なお、プラスミド抽出は数枚のプレートをまとめて行ったが、この際各プレートに生えたコロニーの個数に比例するように培養液を混合した(1枚に1000個のコロニーが生えたプレートの回収後培養液と、100個のコロニーが生えたものの回収後培養液

の場合、前者は後者の10倍の液量を用い、プラスミドを抽出した)。

#### 【0145】

回収されたコロニー数は約238,000であった。この中から、回収時に無作為に選んだ確認用コロニーをインサートチェック及びDNAシーケンスで確認したところ、平均して24個中20個にインサートが含まれ、糖鎖認識部位はDNAシーケンスで確認したプラスミドに関してはそれぞれ違った塩基配列になっていた。そのため、有効コロニー数は、回収したコロニー238,000のうち20/24、約200,000とした。したがって、今回作製したERGICランダムライブラリーのサイズは $2 \times 10^5$ であった。これらのライブラリーは、プレート1枚ごとに一本グリセロールストックを作製し、 $-80^{\circ}\text{C}$ の冷蔵庫で保存した。また、約5000個を一つにまとめてプラスミド抽出を行い、 $-20^{\circ}\text{C}$ に保存した。以降の実施例においては、このプラスミドを実験に使用した。

#### 【0146】

〔実施例7〕ERGICランダムライブラリーのMDCK細胞を用いた発現  
本実施例においては、実施例6で作製したERGICランダムライブラリーを、MDCK細胞にトランスフェクションし、発現させた。その後、ウェスタンブロットティング法(実施例8)、間接蛍光抗体法(実施例9)により発現確認を行った。

#### 【0147】

##### (1) トランスフェクション効率の検討

MDCK細胞にERGICランダムライブラリーをトランスフェクションする前に、条件検討を行った。具体的には、Effecteneトランスフェクション試薬(QIAGEN)及びLipofectamine<sup>TM</sup> 2000試薬(Invitrogen)を使用し、pIRES-EGFP(CLONTECH)をMDCK細胞にトランスフェクトし、EGFP遺伝子を一過的に発現させた。その後、蛍光標示式細胞分取器(以下FACSという)を用いて蛍光強度を測定することによりトランスフェクションの効率を検討した。

#### 【0148】

##### (1-1) Effecteneトランスフェクション試薬を用いた効率検討

0.526  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  の pIRES-EGFP (CLONTECH) を用いて、Effectene トランスフェクション試薬 (QIAGEN) の発現効率を検討した。

## 【0149】

具体的には、トランスフェクションの前日に6ウェルプレート (FALCON 3046) に  $4 \times 10^5$  の細胞をまき、37℃、5%  $\text{CO}_2$  で一晩培養した。当日、プレートから培地 (DMEM (SIGMA) 500 ml、非動化 FBS (INTERGEN) 55.5 ml、10 mM HEPES 5 ml、ペニシリン (100 U/ml) - ストレプトマイシン (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 5 ml を混合したもの) を吸い取り、一回 1 × PBS (1 ml) で細胞を洗い、新しい培地を 1.6 ml 加えた (①)。

## 【0150】

一方、15 ml チューブにプラスミド DNA を加え、バッファー EC で合計 100  $\mu\text{l}$  にした。これに促進剤を加え、1 秒間ボルテックスで攪拌し、2～5 分室温に置いたあとスピンドウンした。次に、Effectene トランスフェクション試薬を加え、10 秒間ボルテックスし、5～10 分室温で放置し、その後 600  $\mu\text{l}$  の培地を加え、ピペッティングした (②)。

上記①に②を加え、37℃で48時間培養した。薬剤での選択を行う場合は、トランスフェクション後48時間経過してから添加した。

## 【0151】

また、トランスフェクションの48時間後に、FACSにて発現効率を比較した。具体的には、トランスフェクション後48時間経過した細胞をPBSで2回洗浄したのち、PBS-0.5 mM EDTA を 2 ml 加え、37℃、5%  $\text{CO}_2$  で培養することにより細胞をはがした。細胞がはがれたら FACS バッファー (HBSS (ハanks平衡化塩溶液、日水製薬株式会社) 9.8 g を MilliQ に溶かし、 $\text{NaHCO}_3$  0.35 g、10%  $\text{NaN}_3$  10 ml、20% BSA/ $\text{NaN}_3$  溶液 5 ml を加えて 1 L に調整した) を 2 ml 加え、15 ml チューブに移し、190 × g で 10 分間遠心した後、上清を捨てた。さらに FACS バッファー 2 ml で細胞を一回洗浄し、細胞数を測定した後、190 × g で 10 分間遠

心し、上清を捨てた。

【0152】

細胞が $8 \times 10^6$ 個/mlになるようにFACSバッファーで希釈し、希釈液をFACSチューブへ移した。 $3 \mu\text{g/ml}$ のヨードプロピジウム (SIGMA) を細胞希釈液の1/2量加え、死細胞を染色した。細胞は、FACSCaliburを用いたCell Quest (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems) により解析した。前方散乱光、側方散乱光、ヨードプロピジウム (SIGMA) の染色により生細胞を選別し、10000個の生細胞の情報を収集、解析した。なお、今回は導入したpIRES-EGFP (CLONTECH) のGFPが持つ蛍光を検出し、解析を行った。

【0153】

その結果、 $0.8 \mu\text{g/DNA}$ 、 $6.4 \mu\text{l}$ 促進剤、 $8 \mu\text{l}$  Effectene トランスフェクション試薬、 $99.5 \mu\text{l}$ バッファーECの試薬量を用いた際の効率(3.65%)が最も良い効率であることがわかった。

【0154】

(1-2) Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000試薬を用いた効率検討  
 $0.526 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度のpIRES-EGFP (CLONTECH)  $4 \mu\text{g}/\text{分}$ を用いて、Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000試薬 (Invitrogen) の発現効率を検討した。

【0155】

具体的には、トランスフェクション前日に6ウェルプレート (FALCON 3046) に $4 \times 10^5$ の細胞をまき、 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ で一晩培養し、当日90~95%コンフルエントになるようにした。

【0156】

一方、プラスミドDNA  $4 \mu\text{g}$ を、 $250 \mu\text{l}$ のOpti-MEMに希釈した(①)。 $10 \mu\text{l}$ のLipofectamine<sup>TM</sup> 2000試薬を $250 \mu\text{l}$ のOpti-MEMに希釈し、室温で5分培養した(②)。①と②を混合し、室温で20分静置培養することにより、DNA-Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000試薬複合体が形成されるので、これを細胞に添加し、24時間 $37^\circ\text{C}$

、5%CO<sub>2</sub>で培養した。

【0157】

トランスフェクション後24時間経過した後、培地を新しいものに交換し、さらに24時間培養した。薬剤での選択を行う場合は、トランスフェクション後48時間経過してから添加した。

また、トランスフェクションの48時間後に、上記(1-1)と同様にFACSで解析を行った。

その結果、トランスフェクション効率は8.20%であった。従って、以降のトランスフェクションはLipofectamine<sup>TM</sup> 2000試薬(Invitrogen)を用いて行うこととした。

【0158】

(2) ERGICランダムライブラリーの発現

本実施例では、実施例6で作製したERGICランダムライブラリーをLipofectamine<sup>TM</sup> 2000試薬(Invitrogen)を用いてMDCK細胞にトランスフェクションを行った。この際、ERGICランダムライブラリーは制限酵素処理によりリニアにしたものをトランスフェクションした。

【0159】

実施例6で作製したERGICランダムライブラリー全て( $2 \times 10^5$ )をScalIで制限酵素処理し、Qiaquick Nucleotide Removal Kit(QIAGEN)にて精製した。なお、ERGICランダムライブラリーであるが、全てのコロニーが同じ割合で含まれるように計算して混ぜ合わせたものを使用した(500個のコロニーを回収して得たプラスミドと、5000個のコロニーを回収して得たプラスミドの場合、それぞれの濃度を測定し、後者が前者の10倍のDNA量になるようにした)。精製後、分光光度計(JASCO、V-550)を用いて濃度を測定した。

【0160】

トランスフェクション前日に6ウェルプレート(FALCON、3046)にMDCK細胞を $4 \times 10^5$ 個まき、37℃、5%CO<sub>2</sub>で一晩培養した。上記細胞にERGICランダムライブラリー(ScalIカット済)を1ウェルあたり4μ

g Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 試薬 (Invitrogen) を用いてトランスフェクトし、24 時間 37℃、5%CO<sub>2</sub>で培養した。

【0161】

トランスフェクションから24時間後、培地を新しいものに交換し、さらに24時間37℃、5%CO<sub>2</sub>で培養した。

トランスフェクションから48時間後、1.5mg/mlのG418を含む培地に交換し、選択を開始した。選択開始後、一日一回は細胞を観察し、選択の進み具合を確かめた。

【0162】

選択開始から10日後、1.5mg/mlのG418を含む培地中で増殖してきた細胞を、トランスフェクションがうまくいった細胞であるとして、トリプシン-EDTA (SIGMA) 処理して細胞をプレートからはがした後、細胞数を数えた。

【0163】

G418添加後10日目にはプレート一面が細胞に覆われていた。そこで、細胞数を計算したところ、6ウェルプレート1枚で $9.5 \times 10^6$ 個であった。以降、この細胞の一部を用いて、ウエスタンブロッティング法 (実施例8) 及び間接蛍光抗体法 (実施例9) による発現確認を行うこととした。

【0164】

【実施例8】 ウエスタンブロッティング法を用いた発現確認

上記実施例7においてMDCK細胞にトランスフェクトし、G418で選択を行って得たものに、ERGICランダムライブラリーが正しく発現しているかどうかを、ウエスタンブロッティング法を用いて確認した。なお、コントロールには何もトランスフェクトしていないMDCK細胞を用いた。

【0165】

実施例7においてG418での選択後10日目の細胞の一部を24ウェルプレート (FALCON、3047) に移し、ウェルが細胞でいっぱいになるまで37℃、5%CO<sub>2</sub>で培養した。また、コントロールに使用するMDCK細胞も24ウェルプレート (FALCON、3047) にまき、同様に培養した。



## 【0166】

ウェルが細胞でいっぱいになったらトリプシン-EDTA (SIGMA) 50  $\mu$ l を加え、37℃、5%CO<sub>2</sub>で20分程度培養することにより細胞をはがした。はがれた細胞に培地を500  $\mu$ l 加え、1000 rpmで5分間遠心し、上清を捨てた。残ったペレットを1×PBSで2～3回洗浄した。

## 【0167】

洗浄済みの細胞のペレットを50  $\mu$ l の1×PBSで懸濁し、そこに2×SDS可溶化バッファー（還元）を25  $\mu$ l 加え、100℃で5分間熱処理し、12.5%ポリアクリルアミドゲルを使用して、200Vで45分間電気泳動した。なお、マーカーとして、タンパク質分子量マーカー「第一」III（第一化学薬品）を使用した。

## 【0168】

ウェスタンブロッティング法を用いて、上述の通り電気泳動したタンパク質をPVDF膜 (Immobilon<sup>TM</sup> Transfer Membranes, Millipore) へ100Vで60分間転写した。転写後、マーカー部分を切り取り、CBBで染色、脱染色を行った。残りの膜はブロッキング溶液に浸して4℃で一晩放置した（膜が均一にブロッキング溶液に浸るように、振とうした）。

## 【0169】

ブロッキング後の膜をハイブリバッグソフト（コスモバイオ）に入れ、抗体と反応させた。1次抗体としては、抗FLAG抗体（m2Ab、IBI）を1  $\mu$ g / ml の濃度にブロッキング溶液で希釈した溶液（4.5 ml）を用い、室温で2時間反応させた。その後、洗浄バッファーで5分間×3回洗浄し、2次抗体と反応させた。2次抗体にはヤギ抗マウスアルカリホスファターゼコンジュゲート（BIORAD）を3000倍希釈の濃度にブロッキング溶液で希釈した溶液（4.5 ml）を用い、室温で30分間反応させた。その後、洗浄バッファーで15分間、5分間×2回の計3回洗浄した。洗浄後、膜を発色基質溶液に浸し、膜にバンドが見えるまで放置した。発色をとめたいところで水道水で膜を洗い、風乾した。

## 【0170】

MDCK細胞にERGICランダムライブラリーをトランスフェクトし、G418で10日間選択した後の細胞をウエスタンブロッティングで発現確認した。コントロールのMDCK細胞と比較してみると、分子量マーカーの66KDaと42KDaの間にコントロールには見られないバンドがあった。ERGIC-53は、その名の通り分子量は53KDaであり、このバンドの位置とほぼ一致していた。ゆえに、ERGICランダムライブラリーがMDCK細胞に発現していることが確認された。

#### 【0171】

##### 〔実施例9〕 間接蛍光抗体法を用いた発現確認

上記実施例8において、MDCK細胞にERGICランダムライブラリーをトランスフェクションし、G418での選択を10日間行った細胞が、ERGICランダムライブラリーを発現していることはウエスタンブロッティングによって確認された。つぎに、間接蛍光抗体法を用いた観察により、トランスフェクションした細胞のうち何%の細胞がERGICランダムライブラリーを過剰発現しているかを確認した。間接蛍光抗体法とは非標識抗体を抗原と反応させ、ついで蛍光標識した2次抗体を1次抗体に結合させ抗原を追跡する方法である。1次抗体は2次抗体の抗原として働き、2次抗体として蛍光標識免疫グロブリン抗体が利用されることにより、組織や細胞の抗原物質の存在又は分布の分析を感度良くおこなうことができる。ライブラリーを構成するERGICにはFLAGタグがついているので、1次抗体として抗FLAG抗体(m2Ab、IBI)を、2次抗体としてヤギ抗マウスIgG<sub>1</sub>-FITCコンジュゲートを用い、蛍光顕微鏡で観察を行った。なお、ネガティブコントロールには何もトランスフェクトしていないMDCK細胞を、ポジティブコントロールにはVIP36-FLAG clone 8 (FLAGタグ付のVIP36が恒常的に発現している事が確認されている細胞株)を使用した。

#### 【0172】

6ウェルプレート(FALCON、3046)に高圧加熱滅菌済のカバーガラス(MATSUNAMI)をしき、その上に実施例7においてG418での10日間の選択後の細胞の一部( $2 \times 10^5$ 個)をまき、ウェルが細胞で90%ほど

覆われるまで37℃、5%CO<sub>2</sub>で培養した。また、コントロールに使用するMDCK細胞、VIP36-FLAG clone 8も同様に培養した。

## 【0173】

サンプル作製当日カバーガラスがある程度細胞で覆われていることを確認した。培地を捨て、PBSで一回洗浄した後、4%パラホルムアルデヒド/PBSを1ml添加し、室温で60分間処理をして細胞を固定した。その後、1回PBSで洗浄した。

## 【0174】

0.1% Triton X-100/PBS (1ml) で室温で30分間処理して細胞膜を壊した。その後、PBSで5分間×3回洗浄した。

ブロッキング溶液 (1ml) を用いて室温で15分間ブロッキングした。その後、PBSで5分間×3回洗浄した。

## 【0175】

2μg/mlの濃度にブロッキング溶液を用いて希釈した抗FLAG抗体 (m2Ab、IBI) を200μlカバーガラス上に添加して、室温で60分間反応させた後、PBSで10分間×3回洗浄した。

## 【0176】

ブロッキング溶液 (1ml) を用いて室温で15分間再度ブロッキングした。その後、PBSで5分間×3回洗浄した。

2μg/mlの濃度にブロッキング溶液を用いて希釈した抗マウスIgG<sub>1</sub>-FITC (CBL1000F) を200μlカバーガラス上に添加して、遮光し、室温で60分間反応させた後、PBSで10分間×3回洗浄した。

## 【0177】

DAPI (Molecular Probes) 3μlとslow fade (Molecular Probes) 溶液A 3μlをスライドガラス (MATSUMI) にたらした。その上にカバーガラスを細胞が接着している面が下になるように置き、マニキュアで封入してサンプルとした。サンプルは遮光し、4℃で保管した。

## 【0178】

作製したサンプルを蛍光顕微鏡 (OLYMPUS、BX52) で観察した。ま

ず、ネガティブコントロールのMDCK細胞を、次にポジティブコントロールのVIP36-FLAG clone 8を観察し、抗体反応がうまくいっているかどうかを確認した。次に、MDCK細胞にERGICランダムライブラリをトランスフェクトして発現させた細胞の観察を行った。具体的には、サンプルの左右両側から無作為に数箇所を選択して撮影し、その写真に写っている全細胞数及びFITC陽性細胞数を計数し、何個に発現が見られるかを数値化した。

## 【0179】

蛍光顕微鏡用サンプルの写真の結果として図9に示す。なお、この写真であるが、細胞の位相差像（グレー）とFITCで染色した像（緑色）を重ね合わせたものである。ネガティブコントロールのMDCK細胞の写真を図9Aに、ポジティブコントロールのVIP36-FLAG clone 8の写真を図9Bに示す。ポジティブコントロールは、各細胞が非常に強い緑色を発している、つまり2次抗体であるFITCで染まっているのが見て取れる。

## 【0180】

MDCK細胞にERGICランダムライブラリーをトランスフェクトし、1.5 mg/mlのG418で10日間選択を行った後の細胞の観察を行ったものを図9Cに示す。これは、1枚の写真あたり1個若しくは2個の細胞が非常に強い緑色を発している、つまり2次抗体であるFITCに強く染まっている。撮影した8枚の写真に写っている細胞の数の総計は387個であり、そのうちFITCに強く染まっている細胞は12個であった。つまり、今回観察したサンプルのうち、12個/387個、3.1%が発現している細胞であると言える。

## 【0181】

〔実施例10〕植物レクチンの糖結合特異性に基づいたMACSによるERGICランダムライブラリー発現細胞の選別及びFACSによる解析

本実施例においては、植物レクチンの糖結合特異性に着目し、MACSによるERGICランダムライブラリー発現細胞の選別を行った。具体的には、ERGICランダムライブラリー発現細胞を、ビオチン標識してあるマメ科レクチン数種類で1次標識した後、ストレプトアビジンマイクロビーズを用いて磁気標識し、磁気細胞分離システム (Magnetic Cell Sorting and Separation of Biomolec

ules、以下MACSと略す)で選別した。その後、FACSで選別後の細胞の解析を行った。

#### 【0182】

(1) ERGICランダムライブラリー発現細胞のMACSによる選別

ビオチン標識レクチンとして、Biotin-Lectin set I、II (ホーネンコーポレーション)を使用した。ConA、BPA、ABA、WGA、SBA、SSA、DBA、DSA、RCA120、LCA、PNA、PHA-L4、PHA-E4、Lotus、UEA-I、及びMAMをそれぞれ1mg/mlのものをPBSで希釈し、10 $\mu$ g/mlに調整し、0.45 $\mu$ mのフィルター(MILLEXOR-HV)を用いて滅菌した。

MACSによる選別を行う2日前に、10cmディッシュ16枚に細胞を4 $\times$ 10<sup>5</sup>個まき、37℃、5%CO<sub>2</sub>で培養した。

#### 【0183】

当日、細胞をPBSで2回洗浄し、PBS-0.5mM EDTAを5ml添加し、37℃、5%CO<sub>2</sub>で培養することにより細胞をはがした。190 $\times$ gで5分間遠心し、上清を捨てた。

#### 【0184】

細胞に各レクチン(10 $\mu$ g/ml、2ml)を加え、氷上で30分間反応させた後、30 $\times$ gで10分間遠心し、上清を取り除いた。300 $\mu$ lのラベリングバッファーで洗浄後、300 $\times$ gで10分間遠心し、上清を取り除いた。

#### 【0185】

細胞を90 $\mu$ lのラベリングバッファーで懸濁し、そこにストレプトアビジンマイクロビーズ(Miltenyi Biotec GmbH)を10 $\mu$ l加え、6~12℃で15分間反応させた。500 $\mu$ lの分離バッファー(PBS pH7.2、2mM EDTA、0.5%BSAをMilli-Q水で調整し、フィルター滅菌したもの)で洗浄、300 $\times$ gで10分間遠心し、上清を取り除いた後、500 $\mu$ lの分離バッファーで懸濁した。

#### 【0186】

MiniMACS(Miltenyi Biotec GmbH)の磁石にMS分離カラム(Milten

yi Biotec GmbH) をセットし、 $500\mu\text{l}$  の分離バッファーを流した。その後、上記細胞懸濁液をMS分離カラムにかけ、カラムから流出してきた細胞を陰性細胞（素通り）として回収した。 $500\mu\text{l}$  の分離バッファーを3回MS分離カラムにかけ、ここで流出してきた細胞も陰性細胞（素通り）として回収した。

カラムを磁石から外し、分離バッファー $1\text{ml}$  をカラムに載せ、注射器のプランジャーで押し出すことにより流出してきた細胞を陽性細胞として回収した。

#### 【0187】

得られた陽性細胞と陰性細胞（素通り）を $300\times g$  で10分間遠心した後、上清を取り除いた。適当量の培地（ $1.0\text{mg/ml}$  G418添加剤）にペレットを懸濁し、適当なサイズのプレート（ $6\text{cm}$ ディッシュ若しくは $10\text{cm}$ ディッシュ）にまき、再培養した。

#### 【0188】

本実験は、レクチンの持つ糖結合特異性を利用して、細胞表面の膜タンパク質に付加している糖鎖の種類によって細胞を選別しよう、という意図で行ったものである。ビオチン標識レクチンで標識しMACSにかけた細胞は、全て陰性細胞（素通り）と陽性細胞に分けられた。MACSを行った直後の細胞は、かなりのダメージを受けていると考え、MACSによる選別の翌日に細胞数を数え、どのような比率で分けられたかを確認した。その結果を下記表4に示す。ただし、ビオチン標識RCA120を1次標識として用いてMACSにかけた細胞は、陰性細胞（素通り）・陽性細胞ともに全て死滅した。

#### 【0189】

【表 4】

レクチン名	陰性(素通り)	陽性
ConA	80%	20%
DBA	88%	12%
LCA	90%	10%
PHA-E4	85%	15%
PNA	95%	5%
UEA-I	80%	20%
WGA	86%	14%
ABA	75%	25%
DSA	70%	30%
Lotus	93%	7%
MAM	20%	80%
PHA-L4	82%	18%
SBA	85%	15%
SSA	60%	40%
BPA	90%	10%

## 【0190】

上記表 4 から分かりますと、MACS で選別した細胞のほとんどは素通りに回収され、用いたレクチンによる差異はあまり見られなかった。

今回得た細胞画分のうち、陰性細胞（素通り）を－（マイナス）、陽性細胞としたのち MACS で選別し、素通りに出てきた細胞は ConA（－）、最終的に陽性細胞として回収した細胞を ConA（＋）と名づけ、他のレクチンに関しても同様に標記する。これらの計 30 種類の細胞に対し、下記の実験で FACS による解析を行うこととした。

## 【0191】

## (2) FACS による解析

上記(1)でMACSによる選別を行い、その後順調に増殖した30種類の細胞に対して、FACSによる解析を行った。具体的には、1次抗体としてビオチン化レクチン15種類、2次抗体にはFITC標識されたストレプトアビジン(PIERCE)を反応させて、FACSを用いて蛍光強度の変化をみた。なお、コントロールとして何もトランスフェクトしていないMDCK細胞を用いた。

#### 【0192】

FACSを行う前日に、解析したい細胞を6cmに $2 \times 10^5$ 個まいた。当日に各々の細胞をPBSで2回洗浄した後、PBS-0.5mM EDTAを2.5ml加え、37℃、5%CO<sub>2</sub>で培養することにより細胞をはがした。細胞がはがれたら、FACSバッファー(HBSS(日水製薬株式会社)9.8gをMilliQに溶かし、NaHCO<sub>3</sub>0.35g、10%NaN<sub>3</sub>10ml、20%BSA/NaN<sub>3</sub>溶液5mlを加えて1Lに調整したもの)を2.5ml加え、15mlチューブに移し、1000rpmで10分間遠心した後上清を捨てた。さらにFACSバッファー5mlで細胞を一回洗浄し、細胞数を測定した後、190×gで10分間遠心し、上清を捨てた。

#### 【0193】

細胞が $8 \times 10^6$ 個/ml( $4 \times 10^5$ 個/50μl)になるようにFACSバッファーで希釈し、希釈液を50μlずつ96ウェルU底プレート(3077、FALCON)に移した。各ウェルに1次抗体として、10μg/mlのビオチン標識レクチンを50μlずつ加え、穏やかに混ぜた後、氷上で30分間反応させた。

#### 【0194】

100μlのFACSバッファーを加え、580×gで3分間遠心し、上清を捨てキムタオルに押し当て水分を除いた後、ペレットをボルテックスにかけてほぐした。同様の洗浄操作をさらに2回繰り返した(なお、FACSバッファーは200μlずつ加えて洗浄した)。

#### 【0195】

2次抗体として、ストレプトアビジンFITC(20μg/mlになるようにFACSバッファーで希釈した)を50μl加え、軽く混ぜ遮光して氷上で20



～30分間反応させた。

【0196】

150  $\mu$ l のFACSバッファーを加え、580  $\times$  gで3分間遠心し、上清を捨てキムタオルに押し当て水分を除いた後、ペレットをボルテックスにかけてほぐした。同様の洗浄操作をさらにもう1回繰り返した。

【0197】

ウェルに200  $\mu$ l のFACSバッファーを加え、ピペッティングをしてFACSチューブへ移した。3  $\mu$ g/ml のヨードプロピジウム (SIGMA) を100  $\mu$ l 加え、死細胞を染色した。細胞は、FACScaliburを用いたCell Quest (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems) により解析した。前方散乱光、側方散乱光、ヨードプロピジウム (SIGMA) の染色により生細胞を選別し、10000個の生細胞の情報を収集、解析した。

【0198】

ERGICランダムライブラリーは、ERGIC-53の糖鎖認識部位にあたるアミノ酸をランダムイズしてある。ERGIC-53は小胞体とシスゴルジの間を行き来する輸送小胞に存在し、糖タンパク質の選別輸送（糖鎖認識部位がもつ糖結合特異性のため、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存的にマンノースと結合する）を行っている分子である。つまり、糖鎖認識部位をランダムイズすることにより、ERGICランダムライブラリーにはERGIC-53が本来持っているものとは異なる糖結合特異性が生じ、様々な糖鎖を持った糖タンパク質と結合するようになるので、細胞膜表面上に運ばれてくる糖タンパク質の糖鎖の種類にも多様性が生じると思われる。実施例10で行ったMACSでは、用いた各種ビオチン標識レクチンの糖結合特異性（下記表5参照）に基づいて細胞を分取し、それぞれの画分に回収した。一般にレクチンが糖鎖に結合する際、3糖前後の大きさを認識し、その立体構造を識別している。FACSを用いた解析では、ビオチン標識レクチンで染めることにより、どのような種類の糖鎖が、どのような割合で細胞表面に存在するかがわかることになる。

【0199】

【表 5】

レクチン名	由来	特異性
ConA	タチナタマメ	$\alpha$ -D-Man $\alpha$ -D-Glc
DBA	ドリコスマメ	D-GalNAc
LCA	レンズマメ	$\alpha$ -D-Glc $\alpha$ -D-Man
PHA-E4	インゲンマメ	D-GalNAc
PNA	ピーナッツ	D-Gal Gal $\beta$ 1-3GalNAc
UEA-I	ハリエニシダ	$\alpha$ -L-Fuc
WGA	小麦胚芽	D-GlcNAc
ABA	マッシュルーム	$\beta$ -D-Gal
DSA	洋種チョウセンアサガオ	$\beta$ -D-GlcNAc Gal $\beta$ 1-4GalNAc
Lotus	ミヤコグサ	$\alpha$ -L-Fuc
MAM	イヌエンジュ	SA $\alpha$ 2-3Gal
PHA-L4	インゲンマメ	D-GalNAc
SBA	ダイズ	D-GalNAc
SSA	ニホンニワトコ	SA $\alpha$ 2-6Gal/GalNAc
BPA	モクワンジュ	D-GalNAc > D-Gal

【0200】

FACS解析の結果を図10に示す。図10では、MACSでの選別後の細胞とコントロール（野生型MDCK細胞）を比較して、平均蛍光強度にどれほどの差が生じるかを見た。（+）及び（-）の平均蛍光強度がコントロールよりも高くなっていたものは、PNA及びABAで1次標識した後MACSで選別して得られた細胞のみであった。つまり、ERGICランダムライブラリー発現細胞の

なかで、PNAレクチンに特異的に結合する糖鎖を細胞表面に提示している細胞がMACSで選別されたといえる。

#### 【0201】

SBA、DBA、PHA-E4、PHA-L4及びBPAはいずれもD-GalNAcに対して特異的に結合するレクチンである。図10のFACSの結果を見てみると、どのレクチンの場合でも、コントロールと(+) (−)の平均蛍光強度差は殆ど見られなかった。

#### 【0202】

##### 〔実施例11〕 PNAレクチンに特異的な細胞の解析

本実施例においては、実施例10で得られたPNA(+)の細胞をさらにMACSで選別することにより、PNAレクチンに特異的に結合する糖鎖をより多く細胞表面に提示している細胞の分離・取得を試みた。また、FACS及びウエスタンブロッティング法を用いたレクチン染色による解析を行った。

#### 【0203】

##### (1) PNA(+)のMACSによる分離及びFACSによる解析

実施例10で得た、PNA(+)の細胞に関して、さらにMACSで選別し、FACSで解析を行った。なお、FACSの際のコントロールとして、何もトランスフェクトしていないMDCK細胞を用いた。

#### 【0204】

##### (1-1) MACSによるPNA(+)の選別

10cmディッシュ(FALCON、3003)に細胞(PNA(+))を $4 \times 10^5$ 個まき、37℃、5%CO<sub>2</sub>で2日間培養した。

細胞をPBSで2回洗浄し、PBS-0.5mM EDTAを5ml添加することにより、細胞をはがした。190×gで5分間遠心し、上清を捨てた。

細胞にビオチン標識PNAレクチン(10μg/ml、2ml)を加え、氷上で30分間反応させた後、300×gで10分間遠心し、上清を取り除いた。300μlのラベリングバッファーで洗浄後、300×gで10分間遠心し、上清を取り除いた。

#### 【0205】

細胞を90 $\mu$ lのラベリングバッファーで懸濁し、そこにストレプトアビジンマイクロビーズ (Miltenyi Biotec GmbH) を10 $\mu$ l加え、6~12℃で15分間反応させた。500 $\mu$ lの分離バッファーで洗浄、300 $\times$ gで10分間遠心し、上清を取り除いた後、500 $\mu$ lの分離バッファーで懸濁した。

#### 【0206】

MiniMACS (Miltenyi Biotec GmbH) の磁石にMS分離カラム (Miltenyi Biotec GmbH) をセットし、500 $\mu$ lの分離バッファーを流した。その後、上記細胞懸濁液をMS分離カラムにかけ、カラムから流出してきた細胞を陰性細胞 (素通り) として回収した。500 $\mu$ lの分離バッファーを3回MS分離カラムにかけ、ここで流出してきた細胞も陰性細胞 (素通り) として回収した。

カラムを磁石から外し、分離バッファー1mlをカラムに載せ、注射器のプランジャーで押し出すことにより流出してきた細胞を陽性細胞として回収した。

#### 【0207】

得られた陽性細胞と陰性細胞 (素通り) を300 $\times$ gで10分間遠心した後上清を取り除いた。適当量の培地 (1.0mg/ml G418添加液) にペレットを懸濁し、適当なサイズのプレート (6cmディッシュ若しくは10cmディッシュ) にまき、再培養した。

#### 【0208】

その結果、陰性細胞 (素通り) に65%、陽性細胞に35%の細胞が回収された。以降PNA(+)をMACSにかけて回収した陰性細胞をPNA2(-)、陽性細胞をPNA2(+)と呼ぶこととした。1回目のMACS (実施例10) 時には、PNA(-)が95%、PNA(+)が5%の割合で分かれたが、2回目には(+)の画分として回収された細胞の比率が高くなっていた。

#### 【0209】

##### (1-2) FACSによる解析

FACSを行う前日に、解析対象の細胞を6cmディッシュ (FALCON、3002) に $2 \times 10^5$ 個まいた。当日に各々の細胞をPBSで2回洗浄した後、PBS-0.5mM EDTAを5ml加え、37℃、5%CO<sub>2</sub>で培養することにより細胞をはがした。細胞がはがれたら、FACSバッファーを5ml加え

、15mlチューブに移し、 $190\times g$ で10分間遠心した後上清を捨てた。さらにFACSバッファー5mlで細胞を一回洗浄し、細胞数を測定した後、 $190\times g$ で10分間遠心し、上清を捨てた。

#### 【0210】

細胞が $8\times 10^6$ 個/ml ( $4\times 10^5$ 個/ $50\mu l$ ) になるようにFACSバッファーで希釈し、希釈液を $50\mu l$ ずつ96ウェルU底プレート(3077、FALCON)に移した。各ウェルに1次抗体として、 $10\mu g/ml$ のビオチン標識PNAレクチンを $50\mu l$ ずつ加え、穏やかに混ぜた後、氷上で30分間反応させた。

#### 【0211】

$100\mu l$ のFACSバッファーを加え、 $580\times g$ で3分間遠心し、上清を捨てキムタオルに押し当て水分を除いた後、ペレットをボルテックスにかけてほぐした。同様の洗浄操作をさらに2回繰り返した。

#### 【0212】

2次抗体として、ストレプトアビジンFITC ( $20\mu g/ml$  になるようFACSバッファーで希釈した) を $50\mu l$ 加え、軽く混ぜ遮光して氷上で20～30分間反応させた。

#### 【0213】

$150\mu l$ のFACSバッファーを加え、 $580\times g$ で3分間遠心し、上清を捨てキムタオルに押し当て水分を除いた後、ペレットをボルテックスにかけてほぐした。同様の洗浄操作をさらにもう1回繰り返した(なお、FACSバッファーは $200\mu l$ ずつ加えて洗浄した)。

#### 【0214】

ウェルに $200\mu l$ のFACSバッファーを加え、ピペッティングをしてFACSチューブへ移した。 $3\mu g/ml$ のヨードプロピジウム(SIGMA)を $100\mu l$ 加え、死細胞を染色した。細胞は、FACScaliburを用いたCell Quest (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems) により解析した。前方散乱光、側方散乱光、Propidium Iodide (SIGMA) の染色により生細胞を選別し、10000個の生細胞の情報を収集、解析した。

## 【0215】

その結果を図11に示す。PNA(-)、PNA(+)、PNA2(+ )の比較を行った。コントロールとしては何もトランスフェクトしていないMDCK細胞を用いた。図11から、PNA2(+ )の平均蛍光強度はPNA(+ )よりも高くなっており、PNAに特異的に結合する糖鎖を細胞表面により多く提示している細胞がPNA2(+ )には回収されたことが示唆される。

## 【0216】

## (2) ウェスタンブロッティング法を用いたレクチン染色

上記(1)の結果より、PNA2(+ )はPNA(+ )やPNA(- )よりPNAレクチンに特異的に結合する糖鎖をより多く細胞表面に提示している細胞群であると考えられた。そこで、本実施例では、ウェスタンブロッティング法を用い、PNAレクチンによるレクチン染色を行い、PNA(-)、PNA(+ )、PNA2(+ )の染まり方の差を見た。また、ConA、MAM、PHA-E4及びPHALL4の4種類を用いて、PNAとは糖結合特異性が異なるレクチンでもウェスタンブロッティング法を用いたレクチン染色を行い、比較を行った。なお、コントロールとして何もトランスフェクトしていないMDCK細胞を用いた。

6ウェルプレート(FALCON、3046)に細胞をまき、ウェルが細胞で90%程度埋め尽されるまで、37℃、5%CO<sub>2</sub>で培養した。

## 【0217】

細胞が十分増殖したら、細胞用溶解バッファー(10mM EDTA、0.2% Triton X-100、1mM PMSF、1μg/ml ロイペプチンをPBSで調整したもの)を500μl加え、氷上に1~1.5時間置くことにより細胞を溶解させた。

## 【0218】

BCAタンパク質アッセイキット(PIERCE)を使用して溶解バッファーで処理後の細胞溶解液のタンパク質定量を行った。濃度が最も低かった溶液に合わせて細胞溶解液をPBSを用いて希釈した。タンパク質濃度をそろえた各細胞溶解液から10μlを1.5mlチューブに移し、2μlの6×SDS可溶化バッファー(還元)を加え、100℃で5分間熱処理した。その後、12.5%ア

クリルアミドゲルを使用して 2 0 0 V で 4 5 分間電気泳動した。

【 0 2 1 9 】

ウエスタンブロッティング法を用いて、上記電気泳動したタンパク質を P V D F 膜 (Immobilon™ Transfer Membranes, Millipore) へ 1 0 0 V で 6 0 分間転写した。転写後、マーカー部分を切り取り、C B B で染色、脱染色を行った。残りの膜はブロッキング溶液に浸して 4 ℃ で一晩放置した (膜が抗体溶液に均一にブロッキング溶液に浸るように、振とうした)。

【 0 2 2 0 】

ブロッキング後の膜をハイブリバグソフト (コスモバイオ) に入れ、抗体と反応させた。1 次抗体としては、ビオチン標識レクチンを 1  $\mu$  g / m l の濃度にブロッキング溶液で希釈した溶液 (4 . 5 m l) を用い、室温で 2 時間反応させた。その後、洗浄バッファーで 5 分間  $\times$  3 回洗浄し、2 次抗体と反応させた。2 次抗体にはストレプトアビジンアルカリホスファターゼを 1  $\mu$  g / m l の濃度にブロッキング溶液で希釈した溶液 (4 . 5 m l) を用い、室温で 3 0 分間反応させた。その後、洗浄バッファーで 1 5 分間、5 分間  $\times$  2 回の計 3 回洗浄した。洗浄後、膜を発色基質溶液に浸し、膜にバンドが見えるまで放置した。発色をとめたいところで水道水で膜を洗い、風乾した。

【 0 2 2 1 】

結果を図 1 2 に示す。P N A を用いたウエスタンブロッティングでは、P N A 2 ( + ) > P N A ( + ) > P N A ( - ) > コントロールの順番でバンドの濃さが濃くなっていたように見えたが、顕著な差は見られず、P N A への特異性が今回解析した細胞画分すべてで同程度であることが示唆された。また、C o n A、P H A - E 4、P H A - L 4 を用いたウエスタンブロッティングの結果では、コントロールと P N A ( - )、P N A ( + )、P N A 2 ( + ) の染まり方に大きな差は見られなかった。M A M を用いたウエスタンブロッティングの結果では、わずかながらコントロール > P N A ( - ) > P N A ( + ) > P N A 2 ( + ) の順番でバンドが濃くなっているように見えた。ウエスタンブロッティングによるレクチン染色では、細胞膜を溶解し、細胞内外に存在する糖タンパク質をまとめて見ていることになる。P N A に特異的に結合する糖鎖の付加された糖タンパク質が、細胞表面に発現して

いる膜タンパク質には多く存在するが、細胞膜内には生合成過程の糖タンパク質が大部分を占めているので、微妙な差異しか検出できなかった可能性が示唆される。

#### 【0222】

次に、各レクチンによる染まり方を比較してみた場合、コントロール、PNA(-)、PNA(+)、PNA2(+))いずれもConA>PHA-E4、PHA-L4>PNA>MAMという順番で濃く染まっていた。

#### 【0223】

ここで、本実験のウエスタンブロッティングに用いた各レクチンの糖結合特異性について説明する。ConAは、 $\alpha$ -D-Man及び $\alpha$ -D-Glcに対して親和性を示し、アスパラギン結合型糖鎖の2本鎖複合型、高マンノース型、混成型糖鎖と結合するレクチンである。また、PHA-L4とPHA-E4はいずれもD-GlcNAcに対して親和性を示し、アスパラギン結合型糖鎖のなかでも複合型糖鎖に結合する。PNAはD-Galに対して親和性を有し、特にGal $\beta$ 1-3GalNAcに対して強く結合する、Ser/Thr型糖鎖に特異的なレクチンである。そして、MAMはSA $\alpha$ 2-3Galに特異性を持ち、結合にはSA $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAcに強く結合する、シアル酸特異的なレクチンである。糖鎖の生合成過程から見ると、高マンノース型糖鎖はシスゴルジで、複合型糖鎖はメディアルゴルジで、Ser/Thr型糖鎖はトランスゴルジで付加される。そして、シアル酸を持った糖鎖はトランスゴルジの中でもプロセシングの最終過程で付加される。以上のことと、本実験のウエスタンブロッティングでConA>PHA-E4、PHA-L4>PNA>MAMの順に濃いバンドが検出されたことには、相関関係があると考えられる。すなわち、糖鎖のプロセシングにおいて早い段階で付加される糖鎖に特異的なレクチンを用いたウエスタンブロッティングほど、よく染まっている、ということである。このことは、生合成途中の細胞内糖タンパク質が大部分を占め、細胞表面に発現された糖タンパク質の差異が相対的に小さかった可能性が考えられる。

#### 【0224】

(3) トランスゴルジにおける糖鎖付加について



上記（２）で行ったウエスタンブロッティングの結果、MAMとPNAを用いたウエスタンブロッティングではコントロール、PNA（－）、PNA（＋）、PNA 2（＋）の各サンプルのバンドの濃さにほんのわずかではあるが差異が見られるようであった。そこで本実施例では、ウエスタンブロッティングのバンドの濃さを定量化を行った。また、ウエスタンブロッティングでは細胞内外のタンパク質をまとめて溶解して解析するので、生合成過程の細胞内糖タンパク質が大部分を占め、PNAに対する結合特異性を持った膜糖タンパク質との差異をはっきりと見ることが出来ないと考え、フローサイトメトリーによる解析も行った。

## 【 0 2 2 5 】

## （３－１）イメージアナライザーによる解析

上記（２）で得たウエスタンブロッティングの膜をイメージアナライザー（LAS-1000、富士フィルム）を用いて定量化し、バンドの濃さを比較した。

イメージアナライザーを用いての解析は、定量化対象のバンドの濃さの単位面積あたりの平均値を求め、比較した。その結果を下記表 6 に示す。

## 【 0 2 2 6 】

【表 6】

	PNA	MAM
コントロール	4554000	4792000
PNA(－)	4618000	4776000
PNA(＋)	4638000	4750000
PNA2(＋)	4747000	4714000

## 【 0 2 2 7 】

上記表 6 に示すように、PNAを用いたウエスタンブロッティングではコントロール<PNA(－)<PNA(＋)<PNA 2(＋)、MAMを用いたウエスタンブロッティングではコントロール>PNA(－)>PNA(＋)>PNA 2(＋)の順でバンドが濃くなっていた。しかし、その差はそれぞれ 1 %程度であり、微妙な差でしかなかった。ウエスタンブロッティングでは細胞内外のタンパク質をまとめて溶解して解析するので、生合成過程の細胞内糖タンパク質が大部分を占めてい

ることが予想される。それゆえに、レクチンに対する結合特異性に基づいたバンドの濃さの差がはっきりと検出できなかったのかもしれない。

#### 【0228】

##### (3-2) FACSによる解析

次に、FACSを用い、細胞表面の膜糖タンパク質に焦点をあてて解析を行った。FACSを行う前日に、解析対象の細胞（コントロールのMDCK細胞、PNA(-)、PNA(+)、PNA2(+))を6cmディッシュ（FALCON、3002）に $2 \times 10^5$ 個まいた。当日に各々の細胞をPBSで2回洗浄した後、PBS-0.5mM EDTAを5ml加え、37℃、5%CO<sub>2</sub>で培養することにより細胞をはがした。細胞がはがれたら、FACSバッファを5ml加え、15mlチューブに移し、 $190 \times g$ で10分間遠心した後上清を捨てた。さらにFACSバッファ5mlで細胞を一回洗浄し、細胞数を測定した後、 $190 \times g$ で10分間遠心し、上清を捨てた。

#### 【0229】

細胞が $8 \times 10^6$ 個/ml ( $4 \times 10^5$ 個/ $50 \mu l$ )になるようにFACSバッファで希釈し、希釈液を $50 \mu l$ ずつ96ウェルU底プレート（3077、FALCON）に移した。各ウェルに1次抗体として、 $10 \mu g/ml$ のビオチン標識PNAレクチン若しくはMAMレクチンを $50 \mu l$ ずつ加え、穏やかに混ぜた後、氷上で30分間反応させた。

#### 【0230】

$100 \mu l$ のFACSバッファを加え、 $580 \times g$ で3分間遠心し、上清を捨てキムタオルに押し当て水分を除いた後、ペレットをボルテックスにかけてほぐした。同様の洗浄操作をさらに2回繰り返した。

#### 【0231】

2次抗体として、ストレプトアビジンFITC ( $20 \mu g/ml$ になるようFACSバッファで希釈した)を $50 \mu l$ 加え、軽く混ぜ遮光して氷上で20～30分間反応させた。

#### 【0232】

$150 \mu l$ のFACSバッファを加え、 $580 \times g$ で3分間遠心し、上清を

捨てキムタオルに押し当て水分を除いた後、ペレットをボルテックスにかけてほぐした。同様の洗浄操作をさらにもう1回繰り返した。

#### 【0233】

ウェルに200  $\mu$ lのFACSバッファを加え、ピペッティングをしてFACSチューブへ移した。3  $\mu$ g/mlのヨードプロピジウム (SIGMA) を100  $\mu$ l加え、死細胞を染色した。細胞は、FACS caliberを用いたCell Quest (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems) により解析した。前方散乱光、側方散乱光、ヨードプロピジウム (SIGMA) の染色により生細胞を選別し、20000個の生細胞の情報を収集、解析した。

#### 【0234】

1次抗体としてビオチン標識レクチン (MAM、PNA)、2次抗体としてストレプトアビジンFITCを用い、コントロールのMDCK野生型細胞、PNA(-)、PNA(+)、PNA2(+)の4つの細胞画分の蛍光強度を測定し、その平均値を比較した。その結果を図13に示す。図13において、PNAを1次抗体として用いたFACSの結果ではコントロール<PNA(-)<PNA(+)<PNA2(+)の順で平均蛍光強度が高くなっている。一方、MAMを1次抗体として用いたFACSの結果ではコントロール>PNA(-)>PNA(+)>PNA2(+)の順で平均蛍光強度が低くなっており、MAMとPNAを用いたFACSの結果が逆相関を示していた。また、ウェスタンブロッティングにおける染まり方をイメージアナライザーで解析した結果とも一致していた。ここで、糖鎖のプロセッシングという観点からこの結果を考察してみた場合、Ser/Thr結合型糖鎖には、まずGalNAc-Ser/Thr→Gal $\beta$ 1-3GalNAc-Ser/Thr→SA $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc-Ser/Thrの順に糖鎖が付加されていく。PNAはGal $\beta$ 1-3GalNAc-Ser/Thrを特異的に認識し結合するが、これにSA(シアル酸)が付加されると全く認識しない。一方、MAMはSA $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc-Ser/Thrを特異的に認識し結合するレクチンであり、シアル酸が付加されていない段階の糖鎖は認識しない。以上のことと、図13に示した結果をあわせて考えると、PNA2(+)にはGal $\beta$ 1-3GalNAc-Ser/Thrを細胞

表面により多く提示している細胞画分が回収されていると考えられる。

#### 【0235】

以上の実施例5～11においては、ERGIC-53の糖鎖認識決定部位に相当する9アミノ酸(DTFDNDGKK)のうち7アミノ酸をランダムイズ(DXXXNXXXX、Xは任意のアミノ酸を表す)し、ベクターであるpRC-CMV2に導入した、ERGIC-53ランダムライブラリーを作製し、MDCK細胞にトランスフェクトし、組換え体ERGIC-53を強制発現させた。これを本明細書中では「ERGICランダムライブラリー発現細胞」と称している。トランスフェクト後、G418によるセレクションを行い、細胞表面に多種多様な糖鎖を持った糖タンパク質を発現する細胞を選別するために、この細胞を各種ビオチン標識レクチンで1次標識し、その後ストレプトアビジン・マイクロビーズで磁気標識して、磁気細胞分離システム(MACS)を用いた選別を行った。その結果、数種のレクチンと反応するMDCK細胞を分離することができ、特異的なレクチン結合活性を有する(すなわち特異的に糖鎖を認識する)細胞を得ることができた。

#### 【0236】

##### 【発明の効果】

本発明により、糖鎖改変方法及び改変型糖鎖を有するタンパク質を発現する細胞が提供される。特定の構造を有する糖鎖及びそのような糖鎖を有するタンパク質は、医薬分野において必要とされており、それらを簡便かつ迅速に製造できるため、本発明に係る糖鎖改変方法及び改変型糖鎖を有するタンパク質を発現する細胞は有用である。

また、本発明により、多様な糖鎖を発現する細胞からなる糖鎖ライブラリーを作製することができ、未知の糖鎖を生成し、その有用性を検討することも可能となる。

#### 【0237】

##### 【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> YAMAMOTO, Kazuo

Sumitomo Corporation

<120> Sugar chain library generated by genetic modification  
of cargo receptor

<130> P02-0547

<140>

<141>

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2768

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (22)..(1554)

<220>

<221> sig\_peptide

<222> (22)..(112)

<400> 1

ggtcgcgttc cagaatccaa g atg gcg gga tcc agg caa agg ggt ctc cgg 51

Met Ala Gly Ser Arg Gln Arg Gly Leu Arg

1 .5 10

gcc aga gtt cgg ccg ctg ttc tgc gcc ttg ctg ctg tca ctc ggt cgc 99

Ala Arg Val Arg Pro Leu Phe Cys Ala Leu Leu Leu Ser Leu Gly Arg

15 20 25

ttc gtc cgg ggc gac ggc gtg gga gga gac ccc gcg gtc gcg ttg cca 147

Phe Val Arg Gly Asp Gly Val Gly Gly Asp Pro Ala Val Ala Leu Pro

30 35 40

.cat cgc cgt ttc gag tac aaa tac agc ttc aag ggg ccg cac ctg gtg 195

His Arg Arg Phe Glu Tyr Lys Tyr Ser Phe Lys Gly Pro His Leu Val

45 50 55

cag agc gac ggg acc gtg ccc ttc tgg gcc cac gcg ggg aat gct att 243

Gln Ser Asp Gly Thr Val Pro Phe Trp Ala His Ala Gly Asn Ala Ile

60 65 70

cca agt tca gat caa att cga gta gca cca tct tta aaa agc caa aga 291

Pro Ser Ser Asp Gln Ile Arg Val Ala Pro Ser Leu Lys Ser Gln Arg

75 80 85 90

ggc tca gtg tgg aca aag aca aaa gcg gcc ttt gag aac tgg gaa gtt 339

Gly Ser Val Trp Thr Lys Thr Lys Ala Ala Phe Glu Asn Trp Glu Val

95 100 105

gag gtg aca ttt cga gtg act gga aga ggt cga att gga gct gat ggc 387

Glu Val Thr Phe Arg Val Thr Gly Arg Gly Arg Ile Gly Ala Asp Gly

110	115	120	
cta gca att tgg tat gca gaa aat caa ggc ttg gag ggc cct gtg ttt			435
Leu Ala Ile Trp Tyr Ala Glu Asn Gln Gly Leu Glu Gly Pro Val Phe			
125	130	135	
gga tca gct gat ctg tgg aat ggt gtt gga ata ttt ttt gat act ttt			483
Gly Ser Ala Asp Leu Trp Asn Gly Val Gly Ile Phe Phe Asp Thr Phe			
140	145	150	
gac aat gat gga aag aaa aat aat cct gct ata gta att ata ggc aac			531
Asp Asn Asp Gly Lys Lys Asn Asn Pro Ala Ile Val Ile Ile Gly Asn			
155	160	165	170
aat gga caa atc cat tat gac cat caa aat gac ggg gct agt caa gct			579
Asn Gly Gln Ile His Tyr Asp His Gln Asn Asp Gly Ala Ser Gln Ala			
175	180	185	
ttg gca agt tgc cag agg gac ttc cgc aac aaa ccc tat cct gtc cga			627
Leu Ala Ser Cys Gln Arg Asp Phe Arg Asn Lys Pro Tyr Pro Val Arg			
190	195	200	
gca aag att acc tat tac cag aac aca ctg aca gta atg atc aat aat			675
Ala Lys Ile Thr Tyr Tyr Gln Asn Thr Leu Thr Val Met Ile Asn Asn			
205	210	215	
ggc ttt aca cca gat aaa aat gat tat gaa ttt tgt gcc aaa gtg gaa			723
Gly Phe Thr Pro Asp Lys Asn Asp Tyr Glu Phe Cys Ala Lys Val Glu			
220	225	230	

aat atg att atc cct gca caa ggg cat ttt gga ata tct gct gca act 771

Asn Met Ile Ile Pro Ala Gln Gly His Phe Gly Ile Ser Ala Ala Thr

235 240 245 250

gga ggt ctt gca gat gac cat gat gtc ctt tct ttt ctg act ttc cag 819

Gly Gly Leu Ala Asp Asp His Asp Val Leu Ser Phe Leu Thr Phe Gln

255 260 265

ttg act gaa cct gga aaa gag ccg ccc aca cca gat aaa gaa att tcg 867

Leu Thr Glu Pro Gly Lys Glu Pro Pro Thr Pro Asp Lys Glu Ile Ser

270 275 280

gaa aag gaa aaa gaa aag tat cag gag gaa ttt gag cac ttt caa caa 915

Glu Lys Glu Lys Glu Lys Tyr Gln Glu Glu Phe Glu His Phe Gln Gln

285 290 295

gaa ttg gat aaa aaa aaa gag gaa ttc cag aag ggc cac ccc gac ctc 963

Glu Leu Asp Lys Lys Lys Glu Glu Phe Gln Lys Gly His Pro Asp Leu

300 305 310

caa ggg cag cct gcg gag gaa ata ttt gag agt gta gga gat cga gag 1011

Gln Gly Gln Pro Ala Glu Glu Ile Phe Glu Ser Val Gly Asp Arg Glu

315 320 325 330

cta aga caa gtc ttt gaa gga cag aat cgt att cat ctt gaa atc aag 1059

Leu Arg Gln Val Phe Glu Gly Gln Asn Arg Ile His Leu Glu Ile Lys

335 340 345



cag ctg aac cgg cag tta gat atg att ctt gat gaa cag aga aga tat 1107  
Gln Leu Asn Arg Gln Leu Asp Met Ile Leu Asp Glu Gln Arg Arg Tyr  
350 355 360

gtc tct tcc tta aca gag gaa atc tct aaa aga gga gca gga atg cct 1155  
Val Ser Ser Leu Thr Glu Glu Ile Ser Lys Arg Gly Ala Gly Met Pro  
365 370 375

ggg cag cat ggg cag att act caa caa gaa ctg gat act gtt gtg aaa 1203  
Gly Gln His Gly Gln Ile Thr Gln Gln Glu Leu Asp Thr Val Val Lys  
380 385 390

act cag cat gag att ctg aga caa gta aat gaa atg aaa aat tcc atg 1251  
Thr Gln His Glu Ile Leu Arg Gln Val Asn Glu Met Lys Asn Ser Met  
395 400 405 410

agt gaa acc gtc aga ctg gtc agt gga atg cag cac cct ggc tct gct 1299  
Ser Glu Thr Val Arg Leu Val Ser Gly Met Gln His Pro Gly Ser Ala  
415 420 425

gga ggc gtc tat gag aca aca cag cac ttc att gac atc aaa gag cac 1347  
Gly Gly Val Tyr Glu Thr Thr Gln His Phe Ile Asp Ile Lys Glu His  
430 435 440

ctg cac ata gta aag agg gac ata gat aac tta gtg cag cga aat atg 1395  
Leu His Ile Val Lys Arg Asp Ile Asp Asn Leu Val Gln Arg Asn Met  
445 450 455

cca tca aat gaa aag ccg aaa tgc cca gaa cta cca cca ttt cca tca 1443

Pro Ser Asn Glu Lys Pro Lys Cys Pro Glu Leu Pro Pro Phe Pro Ser

460

465

470

tgt ttg tct acg gtc cac ttc att ata ttt gtt gtg gtg caa act gta 1491

Cys Leu Ser Thr Val His Phe Ile Ile Phe Val Val Val Gln Thr Val

475

480

485

490

tta ttc att ggt tat atc atg tat agg tct cag caa gaa gca gct gcc 1539

Leu Phe Ile Gly Tyr Ile Met Tyr Arg Ser Gln Gln Glu Ala Ala Ala

495

500

505

aaa aaa ttc ttt tga ctaccatttt cctgtgtact tcatctattt gtgtacaaaa 1594

Lys Lys Phe Phe

510

tgagtcgttt tgagggaatt taagtattta aattgcttca tagtctaaat tattaatttt 1654

cttaataaaa taactgttta aacattgatt tgcagttaag aataaacctt aaagcaaaga 1714

caaccacatt ttaatttggt cacagtatgt aaatctgtct aaatttcagt gaatttctgg 1774

tcagtatgat gcagcctctg agcagaatat tgaccagtaa gagggtaaata aaagtggggg 1834

caaccctgga tatgaatggt accccctaag tctccaatat tgcaggtttc cctgtataac 1894

gtaaacacac ttgccctcat gcctcccaga atatgaggtc taattaagaa gtccatcagg 1954

tttattttgt aaccaaagtc ttttttagag gtcagacttc ctaatcaaag gcctgggcct 2014

gcagtcctt tcattttaat gcaacttcct ttgaaatcaa agaataattt gtctgagagc 2074

tttaaggatc tggtaataga cttcaaaatg ttaagtgaat ttttttttc ctctatttat 2134

caatgatata tttcactttt aaaggaaatt ttagaggaaa attaatagct gctttttgca 2194

ctaaaaaacc ttgtgggtgg aaatattcct ctgagaatgg cttttatagg tattttgcct 2254

ggtaatgtat tcattcatga ttgcccatat tcttgaatgt ttcttcattc caatggggtc 2314

aggtcaatat tatgaaaata atttttatat ttatatttgt aactaagaat ttatttctcc 2374

ctttactaca cgatgtaaat tcacgtcaaa ttcgatgatc tgaggattta aattcacaaa 2434

acctgccact acattctggt ttacattagt tacttcatgc tggctggggt tagtgaccat 2494

ttgcatactc ttttaaatca aggaggctgt agtagaggca gttttaagat tcttgaaggc 2554

aaaatttgaa aaacagtgaat tacttctaatt tgtttccttt tagtgccaga actaagacat 2614

tgtgaagcac ttgttagtaa acttaacctt gaaatgtcag actggaagga gtttttatgt 2674

ctttgtgcat acttctgggt attacagaaa cagtctgtaa ataacatttt aagatgcaaa 2734

tttaattctg ttcacagctg atttatactg attt 2768

<211> 510

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Gly Ser Arg Gln Arg Gly Leu Arg Ala Arg Val Arg Pro Leu

1 5 10 15

Phe Cys Ala Leu Leu Leu Ser Leu Gly Arg Phe Val Arg Gly Asp Gly

20 25 30

Val Gly Gly Asp Pro Ala Val Ala Leu Pro His Arg Arg Phe Glu Tyr

35 40 45

Lys Tyr Ser Phe Lys Gly Pro His Leu Val Gln Ser Asp Gly Thr Val

50 55 60

Pro Phe Trp Ala His Ala Gly Asn Ala Ile Pro Ser Ser Asp Gln Ile

65 70 75 80

Arg Val Ala Pro Ser Leu Lys Ser Gln Arg Gly Ser Val Trp Thr Lys

85 90 95

Thr Lys Ala Ala Phe Glu Asn Trp Glu Val Glu Val Thr Phe Arg Val

100 105 110

Thr Gly Arg Gly Arg Ile Gly Ala Asp Gly Leu Ala Ile Trp Tyr Ala

115 120 125

Glu Asn Gln Gly Leu Glu Gly Pro Val Phe Gly Ser Ala Asp Leu Trp  
130 135 140

Asn Gly Val Gly Ile Phe Phe Asp Thr Phe Asp Asn Asp Gly Lys Lys  
145 150 155 160

Asn Asn Pro Ala Ile Val Ile Ile Gly Asn Asn Gly Gln Ile His Tyr  
165 170 175

Asp His Gln Asn Asp Gly Ala Ser Gln Ala Leu Ala Ser Cys Gln Arg  
180 185 190

Asp Phe Arg Asn Lys Pro Tyr Pro Val Arg Ala Lys Ile Thr Tyr Tyr  
195 200 205

Gln Asn Thr Leu Thr Val Met Ile Asn Asn Gly Phe Thr Pro Asp Lys  
210 215 220

Asn Asp Tyr Glu Phe Cys Ala Lys Val Glu Asn Met Ile Ile Pro Ala  
225 230 235 240

Gln Gly His Phe Gly Ile Ser Ala Ala Thr Gly Gly Leu Ala Asp Asp  
245 250 255

His Asp Val Leu Ser Phe Leu Thr Phe Gln Leu Thr Glu Pro Gly Lys  
260 265 270

Glu Pro Pro Thr Pro Asp Lys Glu Ile Ser Glu Lys Glu Lys Glu Lys  
275 280 285

Tyr Gln Glu Glu Phe Glu His Phe Gln Gln Glu Leu Asp Lys Lys Lys

290

295

300

Glu Glu Phe Gln Lys Gly His Pro Asp Leu Gln Gly Gln Pro Ala Glu

305

310

315

320

Glu Ile Phe Glu Ser Val Gly Asp Arg Glu Leu Arg Gln Val Phe Glu

325

330

335

Gly Gln Asn Arg Ile His Leu Glu Ile Lys Gln Leu Asn Arg Gln Leu

340

345

350

Asp Met Ile Leu Asp Glu Gln Arg Arg Tyr Val Ser Ser Leu Thr Glu

355

360

365

Glu Ile Ser Lys Arg Gly Ala Gly Met Pro Gly Gln His Gly Gln Ile

370

375

380

Thr Gln Gln Glu Leu Asp Thr Val Val Lys Thr Gln His Glu Ile Leu

385

390

395

400

Arg Gln Val Asn Glu Met Lys Asn Ser Met Ser Glu Thr Val Arg Leu

405

410

415

Val Ser Gly Met Gln His Pro Gly Ser Ala Gly Gly Val Tyr Glu Thr

420

425

430

Thr Gln His Phe Ile Asp Ile Lys Glu His Leu His Ile Val Lys Arg

435

440

445

Asp Ile Asp Asn Leu Val Gln Arg Asn Met Pro Ser Asn Glu Lys Pro

450

455

460

Lys Cys Pro Glu Leu Pro Pro Phe Pro Ser Cys Leu Ser Thr Val His

465

470

475

480

Phe Ile Ile Phe Val Val Val Gln Thr Val Leu Phe Ile Gly Tyr Ile

485

490

495

Met Tyr Arg Ser Gln Gln Glu Ala Ala Ala Lys Lys Phe Phe

500

505

510

<210> 3

<211> 1407

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1071)

<220>

<221> sig\_peptide

<222> (1)..(134)

<400> 3

atg gcg gcg gaa ggc tgg att tgg cgt tgg ggc tgg ggc cgg cgg tgc	48
Met Ala Ala Glu Gly Trp Ile Trp Arg Trp Gly Trp Gly Arg Arg Cys	
1 5 10 15	
ctg gga agg cct ggg ctt ctc ggc ccc ggc cct ggc ccc act aca cct	96
Leu Gly Arg Pro Gly Leu Leu Gly Pro Gly Pro Gly Pro Thr Thr Pro	
20 25 30	
ctc ttt ctt ctt ttg ttg ttg ggg tct gtg act gcg gat ata act gac	144
Leu Phe Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ser Val Thr Ala Asp Ile Thr Asp	
35 40 45	
ggc aac agt gaa cat ctc aag cgg gag cat tcg ctc att aag ccc tac	192
Gly Asn Ser Glu His Leu Lys Arg Glu His Ser Leu Ile Lys Pro Tyr	
50 55 60	
caa ggg gtc ggt tcc agc tct atg ccc ctc tgg gac ttc cag ggc agc	240
Gln Gly Val Gly Ser Ser Ser Met Pro Leu Trp Asp Phe Gln Gly Ser	
65 70 75 80	
act atg ctc acg agc cag tac gta cgt ctg acc cct gac gag cgc agc	288
Thr Met Leu Thr Ser Gln Tyr Val Arg Leu Thr Pro Asp Glu Arg Ser	
85 90 95	
aaa gag ggc tct atc tgg aac cac cag ccg tgc ttc ctc aaa gac tgg	336
Lys Glu Gly Ser Ile Trp Asn His Gln Pro Cys Phe Leu Lys Asp Trp	
100 105 110	
gaa atg cac gtc cac ttc aaa gtc cac ggc aca ggg aag aag aac ctc	384



Glu Met His Val His Phe Lys Val His Gly Thr Gly Lys Lys Asn Leu  
115 120 125

cat gga gac ggc atc gcc ttg tgg tac acc cgg gac cgc ctc gtg cca 432  
His Gly Asp Gly Ile Ala Leu Trp Tyr Thr Arg Asp Arg Leu Val Pro  
130 135 140

ggg cct gtg ttt gga agc aaa gat aac ttc cac ggc tta gcc atc ttc 480  
Gly Pro Val Phe Gly Ser Lys Asp Asn Phe His Gly Leu Ala Ile Phe  
145 150 155 160

ctg gac acc tac ccc aat gat gag acc act gag cgc gtg ttc ccg tac 528  
Leu Asp Thr Tyr Pro Asn Asp Glu Thr Thr Glu Arg Val Phe Pro Tyr  
165 170 175

atc tcg gtg atg gtg aac aat ggc tcc ctg tcc tac gac cac agc aag 576  
Ile Ser Val Met Val Asn Asn Gly Ser Leu Ser Tyr Asp His Ser Lys  
180 185 190

gat ggg cgc tgg acc gag ctg gcg ggc tgc acg gct gac ttc cgc aac 624  
Asp Gly Arg Trp Thr Glu Leu Ala Gly Cys Thr Ala Asp Phe Arg Asn  
195 200 205

cgc gat cac gac acc ttc ctg gct gtg cgc tac tcc cgg ggc cgt ctg 672  
Arg Asp His Asp Thr Phe Leu Ala Val Arg Tyr Ser Arg Gly Arg Leu  
210 215 220

acg gtg atg acc gac ctg gag gac aag aac gag tgg aag aac tgc att 720  
Thr Val Met Thr Asp Leu Glu Asp Lys Asn Glu Trp Lys Asn Cys Ile

225	230	235	240
gac atc acg gga gtg cgc ctg ccc acc ggc tac tac ttc ggg gcc tcc 768			
Asp Ile Thr Gly Val Arg Leu Pro Thr Gly Tyr Tyr Phe Gly Ala Ser			
245	250	255	
gcc ggc acc ggc gac ctg tct gac aat cat gac atc atc tcc atg aag 816			
Ala Gly Thr Gly Asp Leu Ser Asp Asn His Asp Ile Ile Ser Met Lys			
260	265	270	
ctg ttc cag ctg atg gtg gag cac acg ccc gac gag gag agc atc gac 864			
Leu Phe Gln Leu Met Val Glu His Thr Pro Asp Glu Glu Ser Ile Asp			
275	280	285	
tgg acc aag atc gag ccc agc gtc aac ttc ctc aag tcg ccc aaa gac 912			
Trp Thr Lys Ile Glu Pro Ser Val Asn Phe Leu Lys Ser Pro Lys Asp			
290	295	300	
aac gtg gac gac ccc acg ggg aac ttc cgc agc ggg ccc ctg acg ggg 960			
Asn Val Asp Asp Pro Thr Gly Asn Phe Arg Ser Gly Pro Leu Thr Gly			
305	310	315	320
tgg cgg gtg ttc ctg ctg ctg ctg tgc gct ctc ctg ggc atc gtt gtc 1008			
Trp Arg Val Phe Leu Leu Leu Leu Cys Ala Leu Leu Gly Ile Val Val			
325	330	335	
tgc gcc gtg gtg ggg gcc gtg gtg ttc cag aag cgg cag gag cgg aac 1056			
Cys Ala Val Val Gly Ala Val Val Phe Gln Lys Arg Gln Glu Arg Asn			
340	345	350	

aag cgc ttc tac tga gtggcgcctc cggcggggcc tgtccctggg cccaggagcc 1111

Lys Arg Phe Tyr

355

aatgtgaact ttttttttta ccgggattat aaaagaacaa caagatgacc ttatttctta 1171

actgtttcaa ataaatgatt aaagtatttt catacatttt gcttcttgcc cagcagggac 1231

aggtggcaga gccgaggctt agggctctggc accccccaca gctggagacg gaggtctctc 1291

tggggctggt gtctcaggag caggggtctg tgtctacaga tgggctgtgg cccctgcagg 1351

cagctgttga aactggagg gtccccgga ccacactggg gtgggctcct gaggac 1407

<210> 4

<211> 356

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Ala Glu Gly Trp Ile Trp Arg Trp Gly Trp Gly Arg Arg Cys

1

5

10

15

Leu Gly Arg Pro Gly Leu Leu Gly Pro Gly Pro Gly Pro Thr Thr Pro

20

25

30

Leu Phe Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ser Val Thr Ala Asp Ile Thr Asp

35

40

45

Gly Asn Ser Glu His Leu Lys Arg Glu His Ser Leu Ile Lys Pro Tyr

50

55

60

Gln Gly Val Gly Ser Ser Ser Met Pro Leu Trp Asp Phe Gln Gly Ser

65

70

75

80

Thr Met Leu Thr Ser Gln Tyr Val Arg Leu Thr Pro Asp Glu Arg Ser

85

90

95

Lys Glu Gly Ser Ile Trp Asn His Gln Pro Cys Phe Leu Lys Asp Trp

100

105

110

Glu Met His Val His Phe Lys Val His Gly Thr Gly Lys Lys Asn Leu

115

120

125

His Gly Asp Gly Ile Ala Leu Trp Tyr Thr Arg Asp Arg Leu Val Pro

130

135

140

Gly Pro Val Phe Gly Ser Lys Asp Asn Phe His Gly Leu Ala Ile Phe

145

150

155

160

Leu Asp Thr Tyr Pro Asn Asp Glu Thr Thr Glu Arg Val Phe Pro Tyr

165

170

175

Ile Ser Val Met Val Asn Asn Gly Ser Leu Ser Tyr Asp His Ser Lys

180

185

190

Asp Gly Arg Trp Thr Glu Leu Ala Gly Cys Thr Ala Asp Phe Arg Asn  
195 200 205

Arg Asp His Asp Thr Phe Leu Ala Val Arg Tyr Ser Arg Gly Arg Leu  
210 215 220

Thr Val Met Thr Asp Leu Glu Asp Lys Asn Glu Trp Lys Asn Cys Ile  
225 230 235 240

Asp Ile Thr Gly Val Arg Leu Pro Thr Gly Tyr Tyr Phe Gly Ala Ser  
245 250 255

Ala Gly Thr Gly Asp Leu Ser Asp Asn His Asp Ile Ile Ser Met Lys  
260 265 270

Leu Phe Gln Leu Met Val Glu His Thr Pro Asp Glu Glu Ser Ile Asp  
275 280 285

Trp Thr Lys Ile Glu Pro Ser Val Asn Phe Leu Lys Ser Pro Lys Asp  
290 295 300

Asn Val Asp Asp Pro Thr Gly Asn Phe Arg Ser Gly Pro Leu Thr Gly  
305 310 315 320

Trp Arg Val Phe Leu Leu Leu Leu Cys Ala Leu Leu Gly Ile Val Val  
325 330 335

Cys Ala Val Val Gly Ala Val Val Phe Gln Lys Arg Gln Glu Arg Asn  
340 345 350

Lys Arg Phe Tyr

355

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
oligonucleotide

<400> 5

gcatgtcgac ataactgacg gcaacagtg

29

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
oligonucleotide

<400> 6

gagctctaga aagatggcta agccgtggaa

30

<210> 7

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
oligonucleotide

<220>

<223> N=A, T, C or G

<400> 7

cgtgctctag acnnknnknn kaatnnknnk nnknnkgagc gcgtgttccc gta 53

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
oligonucleotide

<400> 8

atcgtcttaa gcactcagta gaagcgcttg 30

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
oligonucleotide

<400> 9

gactacaaag acgatgacga caag

24

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
oligonucleotide

<400> 10

ctagaagtcc ttaagagtcg ggcc

24

<210> 11



<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
oligonucleotide

<400> 11

cgactcttaa ggactt

16

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
oligonucleotide

<400> 12

gtacgtcgac ggCgtgggag gag

23

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
oligonucleotide

<400> 13

cgtatctaga aatattccaa caccattcca

30

<210> 14

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
oligonucleotide

<220>

<223> N=A, T, C or G

<400> 14

cgtatctaga tnnknnknnk aatnnknnkn nknnkaataa tcctgctata gtaattat 58

<210> 15

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic  
oligonucleotide

<400> 15

cgtacttaag tggtagtcaa aagaattttt tg

32

【 0 2 3 8 】

【配列表フリーテキスト】

配列番号 5 ～ 1 5 : 合成オリゴヌクレオチド (N = A, T, G 又は C)

【図面の簡単な説明】

【図 1】

糖タンパク質の糖鎖修飾と糖の品質管理に關与するカーゴレセプター (E R G I C - 5 3 及び V I P 3 6) と、分泌経路の概要を示す図である。

【図 2】

V I P 3 6 ライブラリー構築の概要を示す図である。

【図 3】

V I P 3 6 へのランダム突然変異導入結果を示す図である。

【図 4】

M D C K 細胞における改変 V I P 3 6 の過剰発現を示す図である。

【図 5】

レクチン陽性 (グレー) 及び陰性 (黒) M D C K 細胞に対する植物レクチンの結合を示す図である。上段が非トランスフェクト細胞、中段が変異 V I P 3 6 トランスフェクト細胞、下段が非トランスフェクト対照 M D C K 細胞を示す。

【図 6】

レクチン陽性 (グレー) 及び陰性 (黒) M D C K 細胞に対する P H A - E<sub>4</sub> 及び W G A の結合を示す図である。最上段が野生型細胞、上から 2 段目が変異 V I P 3 6 トランスフェクト細胞の 1 回目の分離後、下から 2 段目が変異 V I P 3 6

トランスフェクト細胞の2回目の分離後、最下段が変異VIP36トランスフェクト細胞の3回目の分離後の結果を示す。

【図7】

レクチン結合にトリプシン処理が及ぼす影響を示す図である。PBS-EDTA処理をグレー、トリプシン-EDTA処理を黒で示す。

【図8】

ERIC-53の糖鎖認識決定部位にランダムな改変を導入するためのランダムプライマーの設計を示す概要図である。

【図9A】

1次抗体として抗FLAG抗体を、2次抗体としてヤギ抗マウスIgG<sub>1</sub>-FITCを用いてサンプルを作製し、蛍光顕微鏡で観察した写真を示す図である。  
A：ネガティブコントロールとして、野生型MDCK細胞を観察した。

【図9B】

1次抗体として抗FLAG抗体を、2次抗体としてヤギ抗マウスIgG<sub>1</sub>-FITCを用いてサンプルを作製し、蛍光顕微鏡で観察した写真を示す図である。  
B：ポジティブコントロールとして、VIP36-FLAG clone 8（恒常的な発現が確認されているクローン）を観察した。

【図9C】

1次抗体として抗FLAG抗体を、2次抗体としてヤギ抗マウスIgG<sub>1</sub>-FITCを用いてサンプルを作製し、蛍光顕微鏡で観察した写真を示す図である。  
C：MDCK細胞にERICランダムライブラリーをトランスフェクトし、1.5mg/mlのG418で10日間選択を行った後の細胞の観察を行った。

【図10】

MACSによる選別後の細胞を1次抗体に各種ビオチン標識レクチン、2次抗体にFITC標識ストレプトアビジンを用いて解析したヒストグラムを示す図である。。黒線はコントロールのMDCK細胞、濃グレーはMACS後の（-）画分、薄グレーは（+）画分を示す。

【図11】

PNAレクチンを用いたMACSにより分画したMDCK細胞をFACSにて

解析したヒストグラムを示す図である。PNA (-)、PNA (+)、PNA 2 (+) のPNAに対する結合強度を比較した。

【図12】

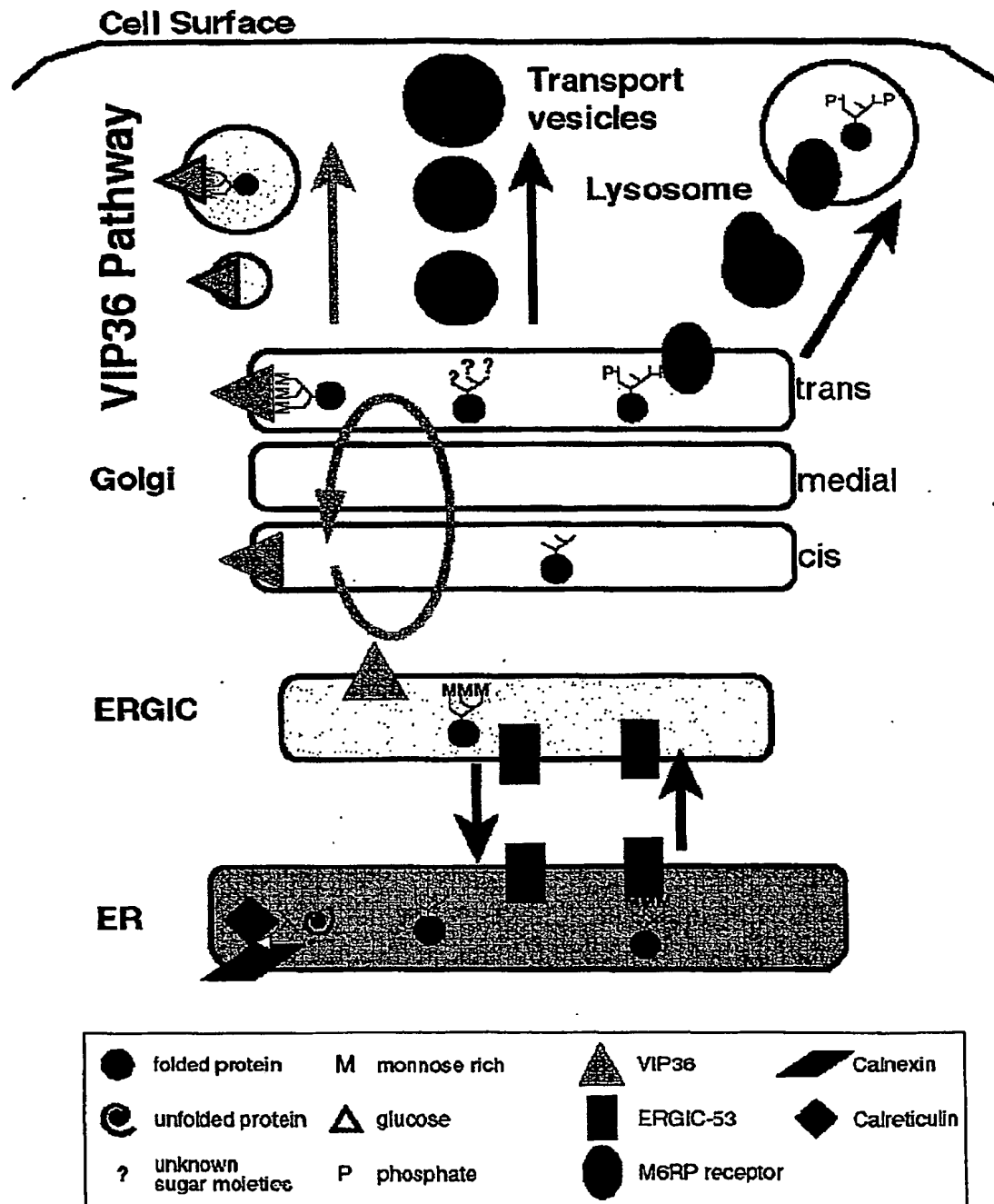
PNA (-)、PNA (+)、PNA 2 (+) について、5種類のビオチン標識レクチンを1次抗体、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼを2次抗体として用いてウエスタンブロッティングを行った結果を示す写真である。

【図13】

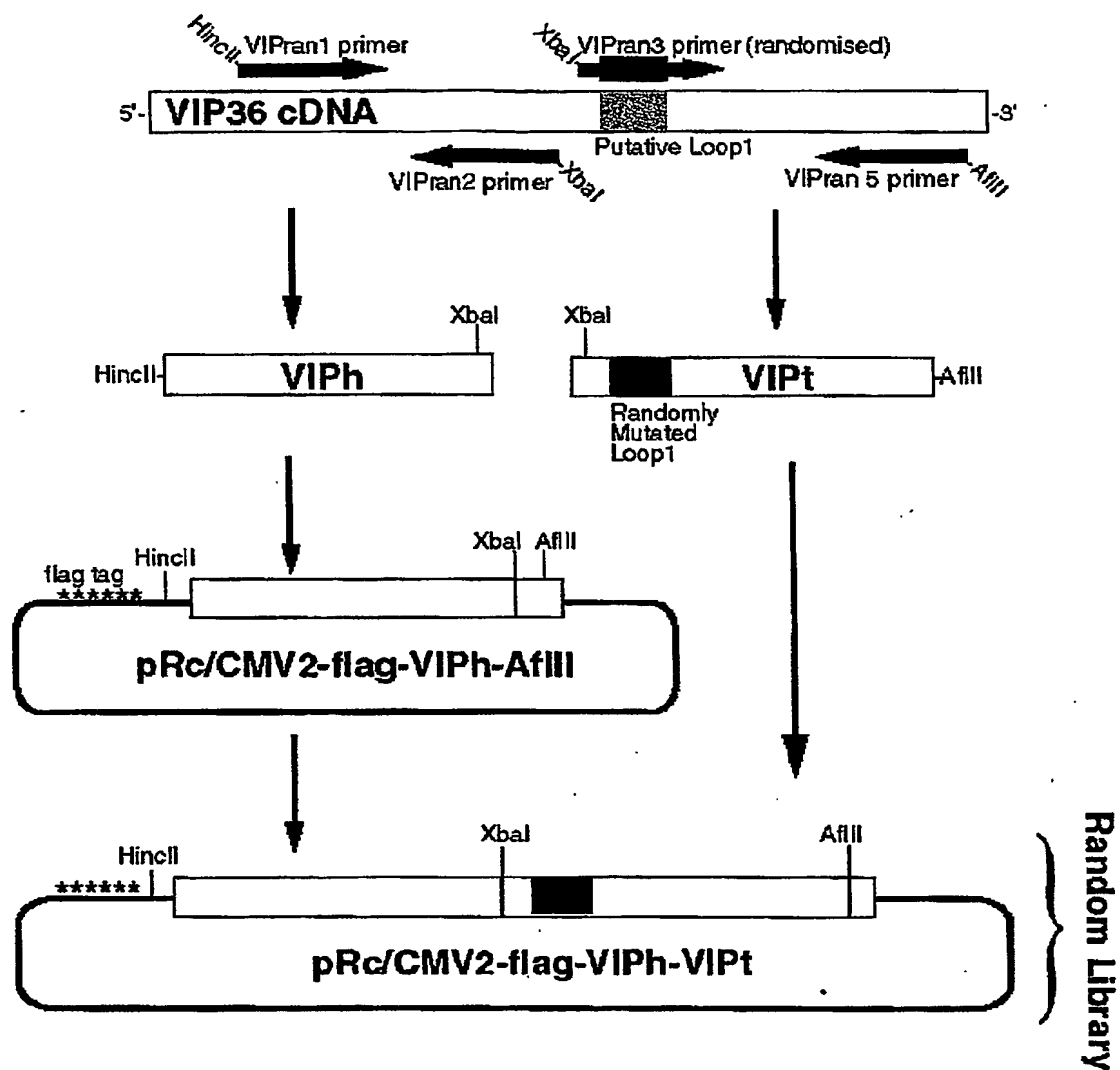
対照、PNA (-)、PNA (+)、及びPNA 2 (+) について、MAM又はPNAを1次抗体、ストレプトアビジンFITCを2次抗体として用いてFACSを行い、各細胞画分の糖結合特異性を解析した結果を示す図である。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



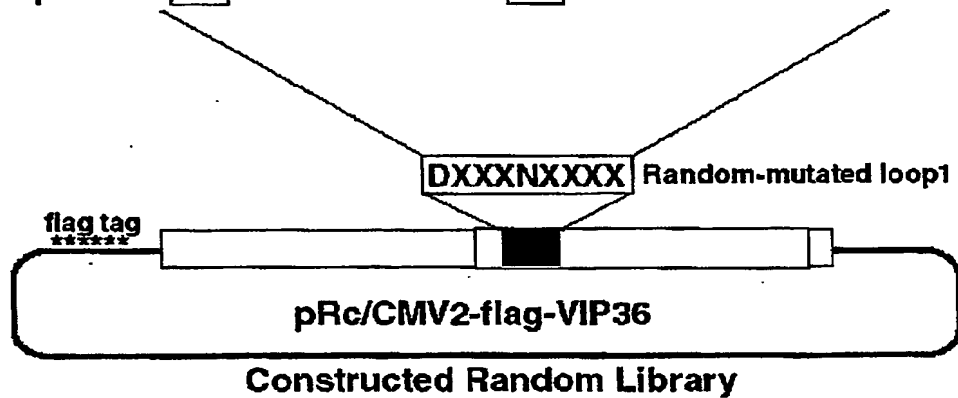
【図 3】

# A

VIP36 original	GAC	ACC	TAC	CCC	AAT	GAT	GAG	ACC	ACT
vip3f clone	GAC	AGG	CAT	GGG	AAT	TAT	AGT	GTT	TAT
vip26f clone	GAC	ATT	CGT	TTG	AAT	CTT	GAG	AGT	GGT
vip28f clone	GAC	CGT	GCG	CTT	AAT	CTT	ATG	CTT	CGT
B8-VIP10.Seq clone	GAC	GTG	TTT	GCT	AAT	CAT	TGT	CAT	TTG
B2-VIP7.Seq clone	GAC	-TG	TGT	GGT	AAT	TGT	GGG	TGT	TAG
B6-VIP9.Seq clone	GAC	CAT	GGG	TTT	AAT	GCT	AAT	CGG	ATT
A3-VIP2.Seq clone	GAC	GTG	TGT	TGG	AAT	GGG	GGG	TGT	AAT

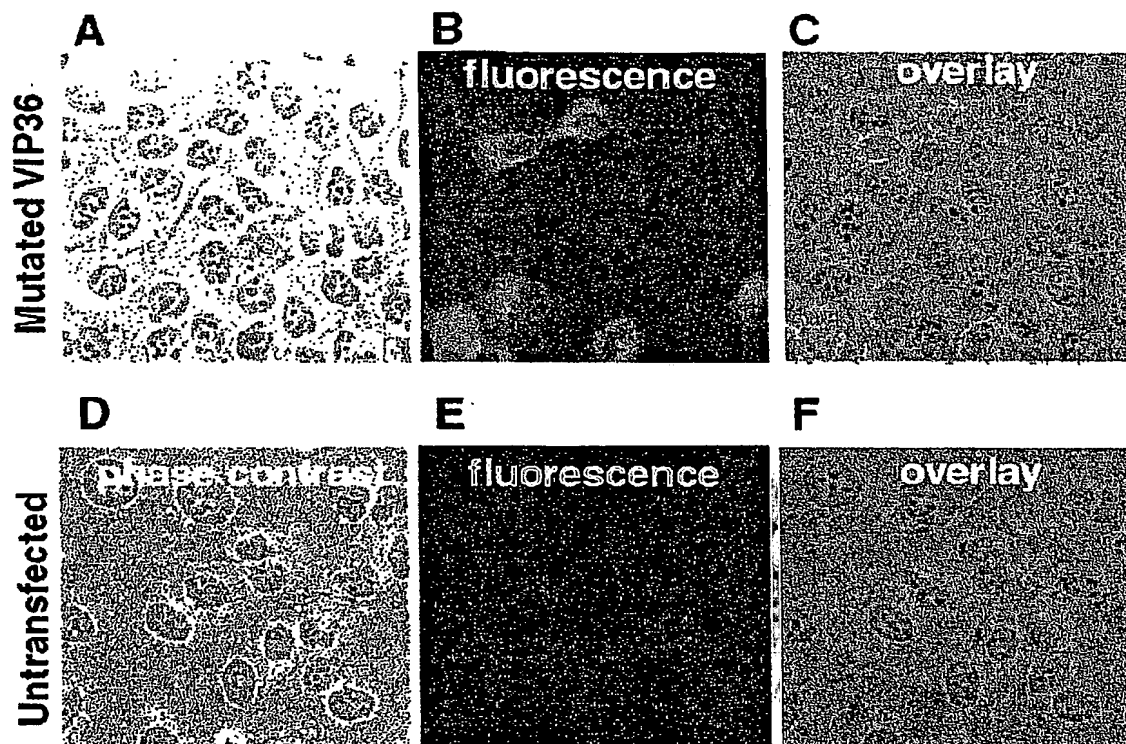
# B

VIP36 original	D	T	Y	P	N	D	E	T	T
vip3f clone	D	R	H	G	N	Y	S	V	Y
vip26f clone	D	I	R	L	N	L	E	S	G
vip28f clone	D	R	A	L	N	L	M	L	R
B8-VIP10.Seq clone	D	T	Y	P	N	D	E	T	T
B2-VIP7.Seq clone	D	-	C	G	N	C	G	C	*
B6-VIP9.Seq clone	D	H	G	F	N	A	N	R	I
A3-VIP2.Seq clone	D	V	C	W	N	G	G	C	N

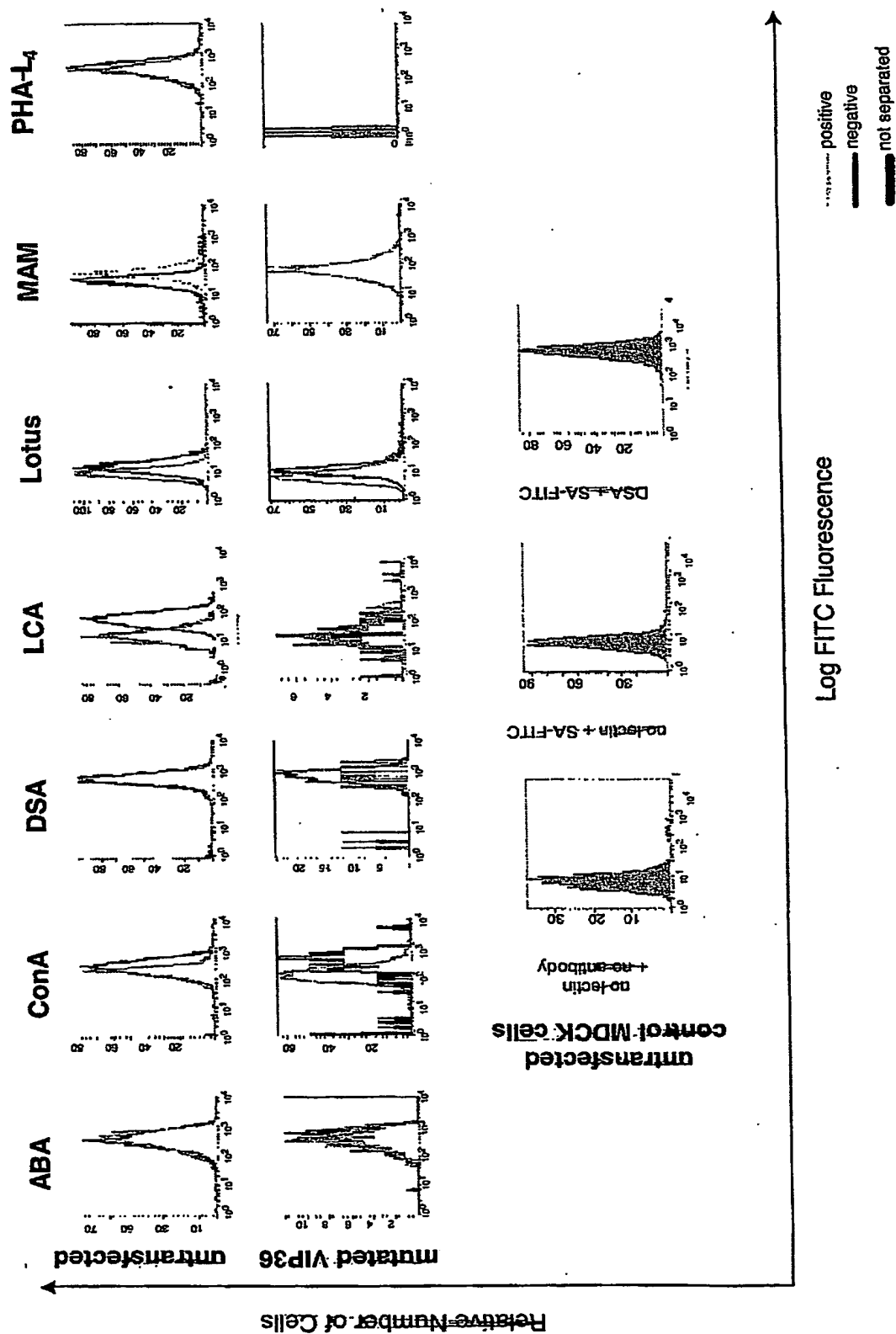




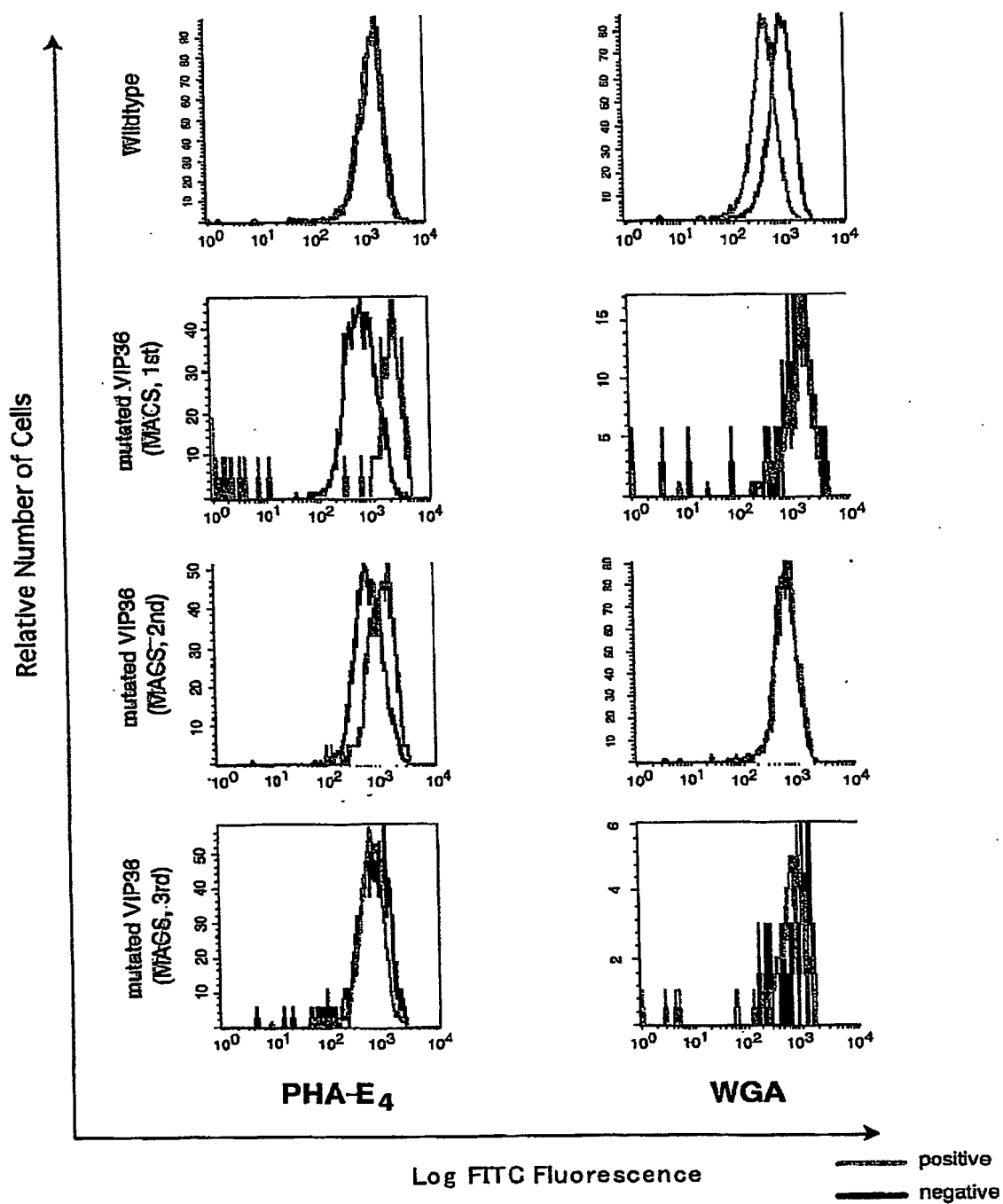
【図4】



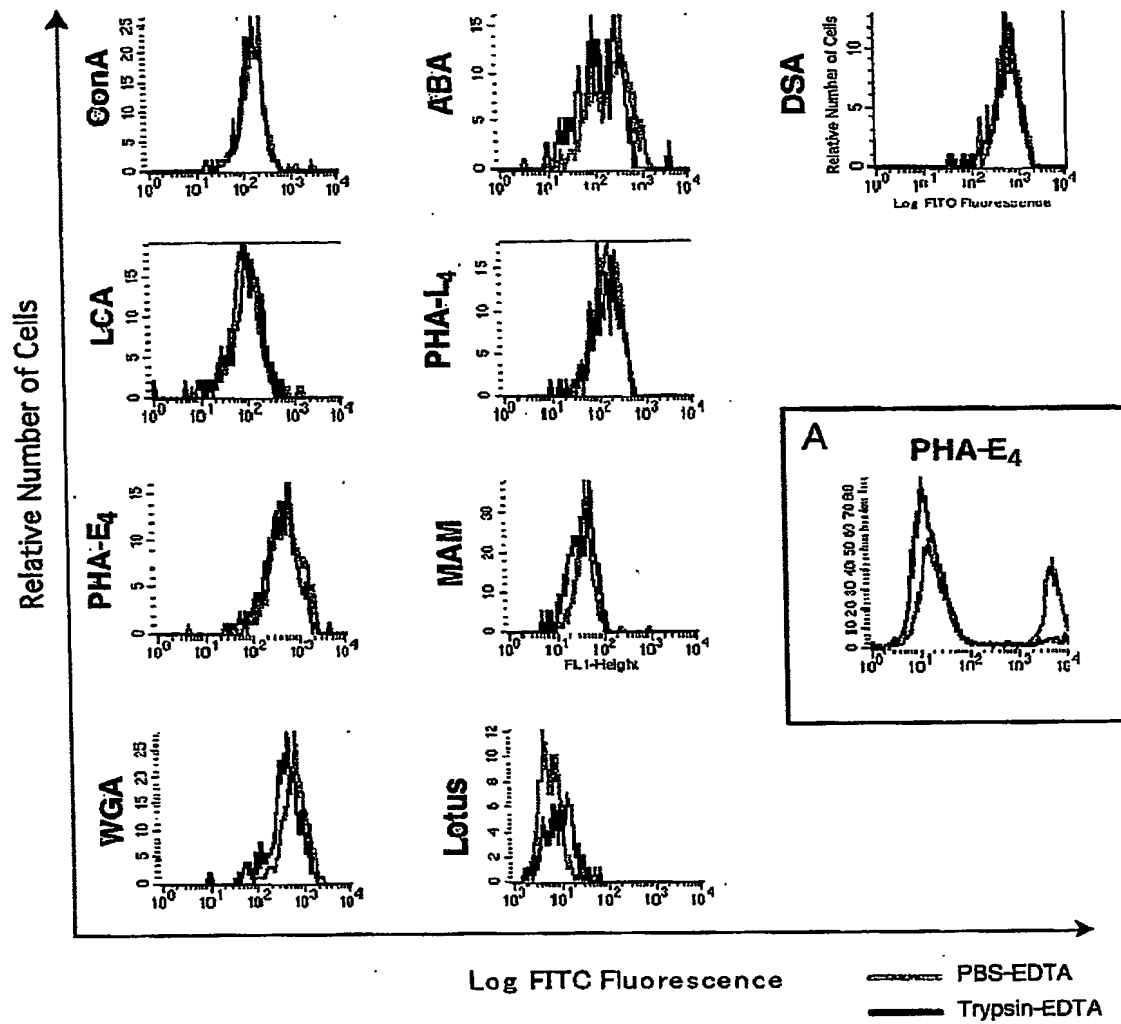
【図 5】



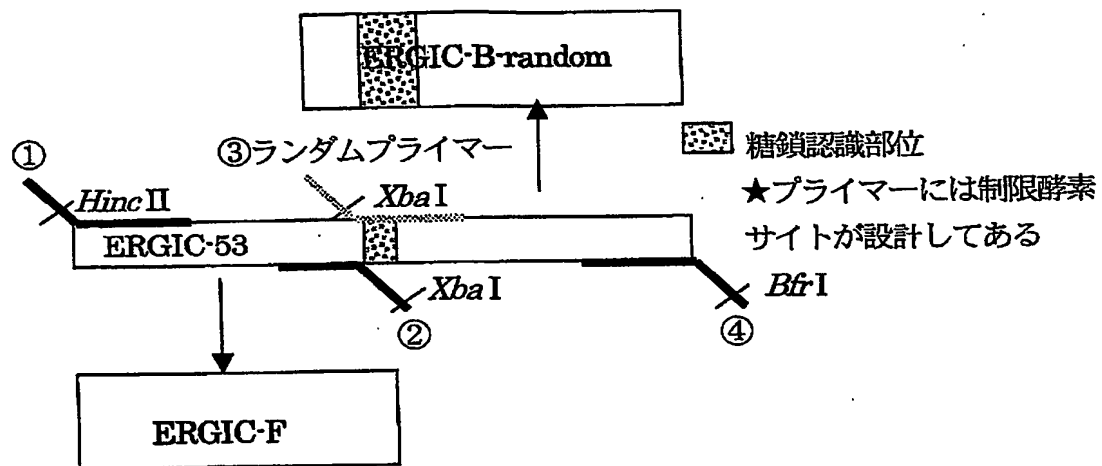
【図6】



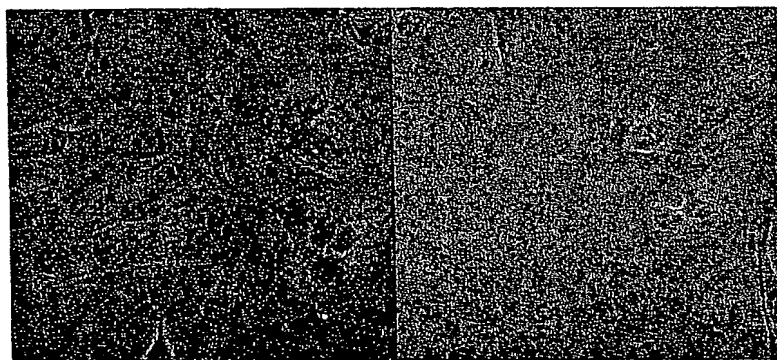
【図7】



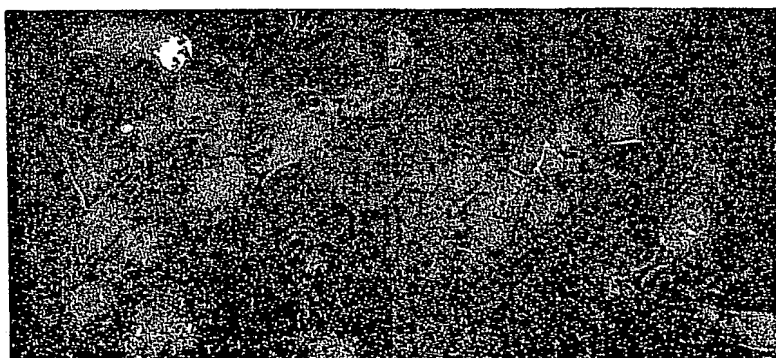
【図 8】



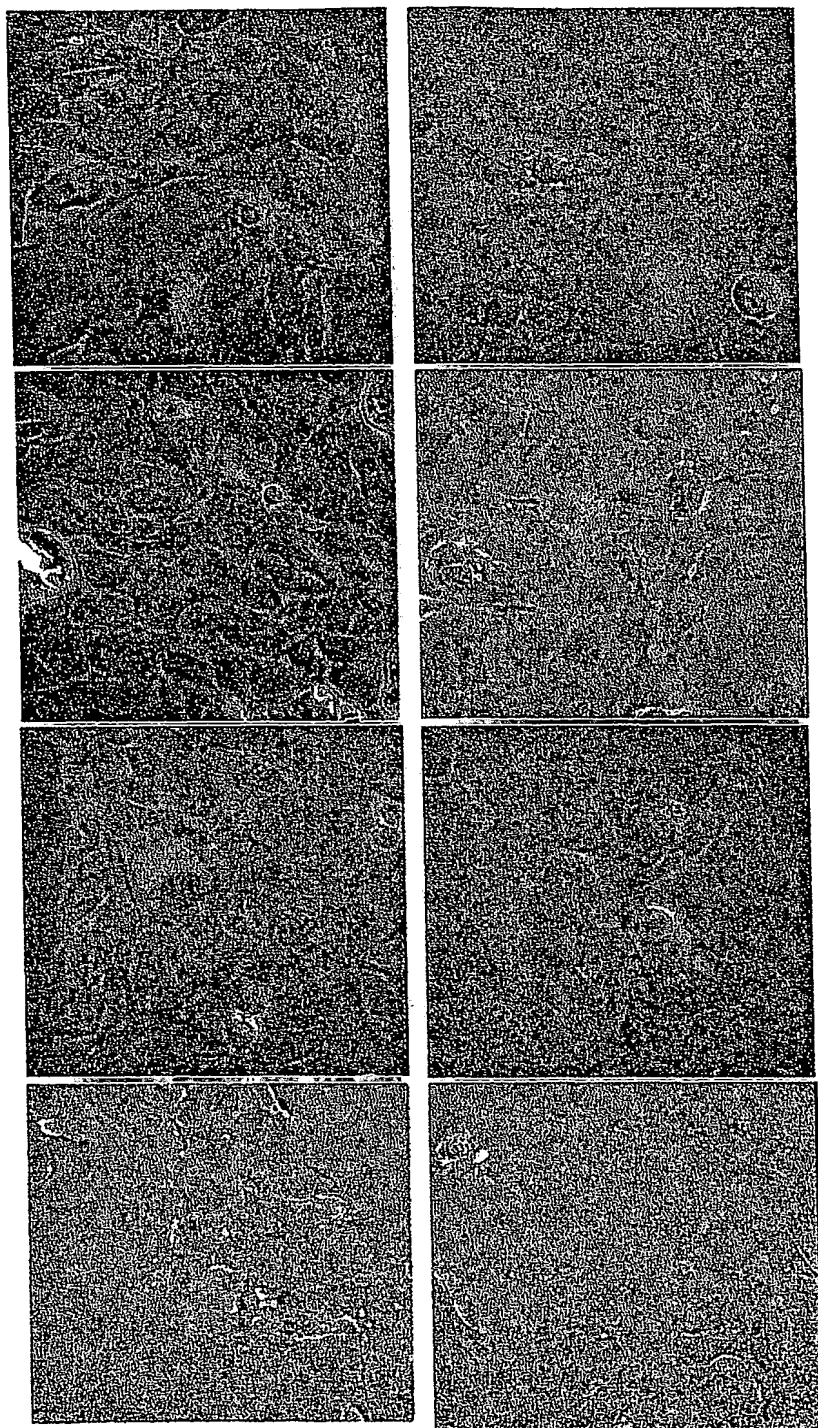
【図 9 A】



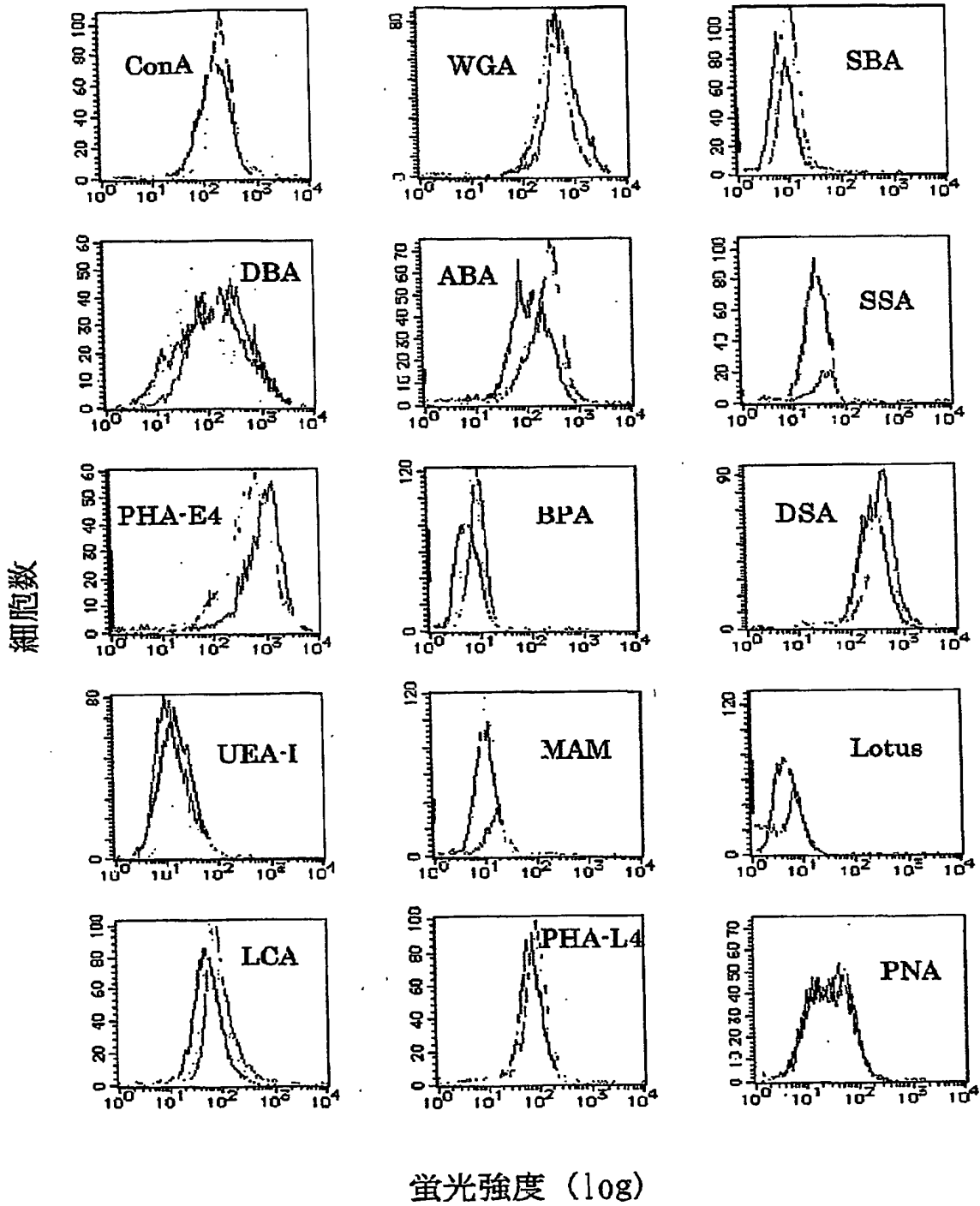
【図 9 B】



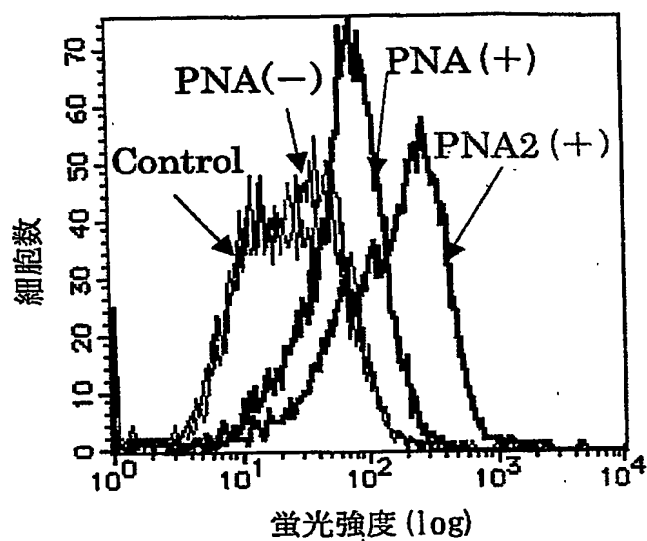
【図 9 C】



【図10】

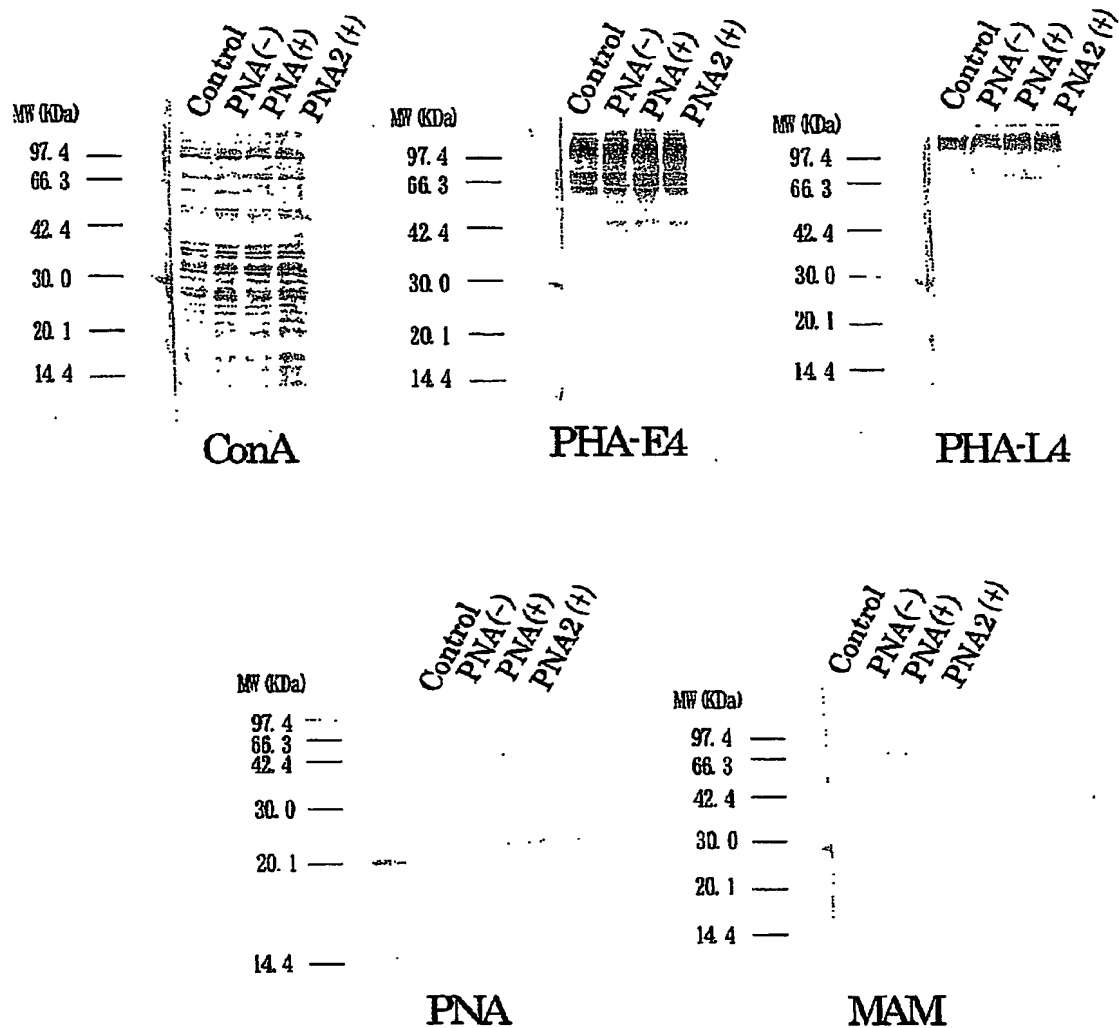


【図11】

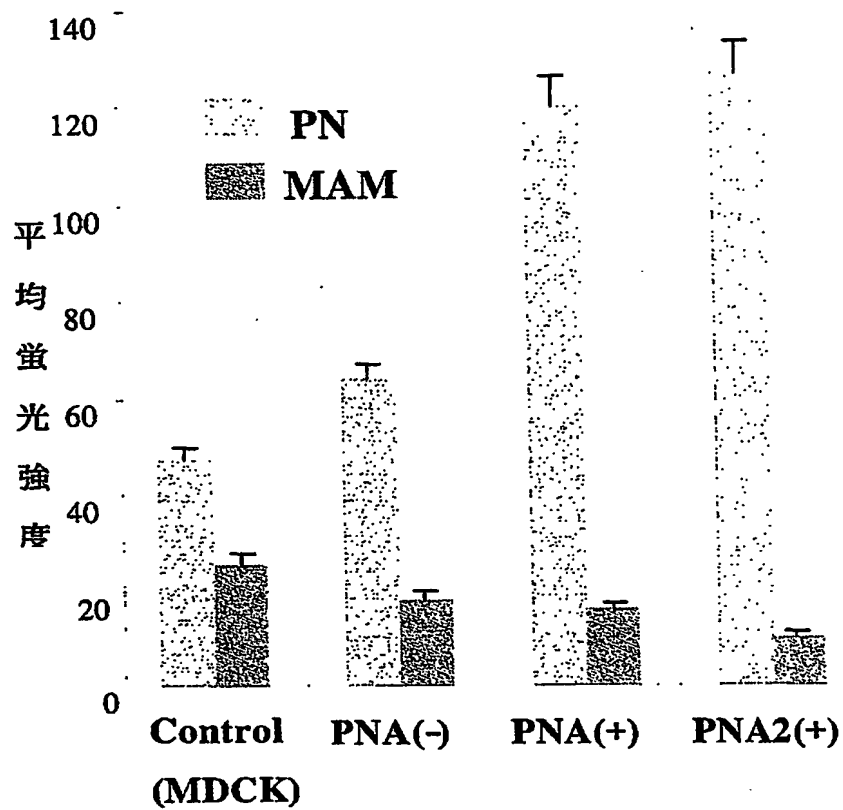




【図 12】



【図 13】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 簡便かつ迅速な糖鎖改変方法、改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞の作製方法、及び糖鎖ライブラリーを提供すること。

【解決手段】 カーゴレセプターの糖鎖認識部位を改変することにより糖鎖結合タンパク質の糖鎖を改変することを特徴とする、糖鎖結合タンパク質の糖鎖改変方法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002129]

1. 変更年月日	2001年 8月 1日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都中央区晴海一丁目8番11号
氏 名	住友商事株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [502300152]

1. 変更年月日 2002年 8月19日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都文京区小石川4-14-24-210

氏 名 山本 一夫

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**